

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



**TESIS DOCTORAL**

**Glomerulopatía del trasplante y su relación con el virus de la hepatitis C**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Dabaiba Regidor Rodríguez**

Directores

**José María Morales Cerdán  
Miguel Ángel Martínez González  
Luis R. Collado Yurrita**

**Madrid, 2017**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

## FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



## TESIS DOCTORAL

Glomerulopatía del Trasplante y su relación con el  
Virus de la Hepatitis C

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Dabaiba Regidor Rodríguez

DIRECTORES

José María Morales Cerdán

Miguel Ángel Martínez González

Luis R. Collado Yurrita.

TESIS DOCTORAL

**GLOMERULOPATÍA DEL TRASPLANTE Y  
SU RELACIÓN CON EL VIRUS DE LA  
HEPATITIS C.**

AUTORA

**DABAIBA REGIDOR RODRÍGUEZ**

DIRECTORES

**Dr. Jose María Morales Cerdán.**

**Dr. Miguel Ángel Martínez González.**

**Dr. Luis R. Collado Yurrita.**

**MADRID, 2015**

*A mis padres y hermana.*

*A Lydia y Jorge.*

*A Ángel.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy las gracias a mis directores de tesis por hacer que una idea se haya convertido en este trabajo de investigación. Al Dr. Jose María Morales, que con sus conocimientos y experiencia generó mi interés en los inicios y ha sido mi maestro en la corrección y análisis del trabajo. Al Dr. Martinez, por su labor diaria con la microscopía electrónica y su generosidad conmigo en la transmisión de conocimientos. Al Dr. Collado, por creer en mi, ofreciéndome su consejo, su exigencia y su estímulo.

Agradecer a mis compañeros del H. Doce de Octubre especialmente a las Dras. Esther González y Natalia Polanco, por estar siempre disponibles y ser el nexo de unión sin el que no hubiera sido posible este trabajo.

De manera especial quiero agradecer la ayuda prestada por la Dra. Simona Alexandru, impulsora de las bases de este trabajo, gracias por tus enseñanzas, tu ejemplo y por tu tiempo.

Agradecer también a todo el equipo de Nefrología del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, con los que siempre puedo contar, en lo humano y en lo científico. Al Dr. Francisco Javier Ahijado, cuya claridad de conceptos, conocimiento de la nefrología y generosidad, fueron claves para reorientarme y dar luz en el estudio. Al Dr. Rafael Díaz-Tejeiro, que me acompaña, anima y enseña todos y cada uno de los días.

Agradecer también a los Dres. Ignacio Leal, Ignacio Gómez y María García, por su ayuda y consejos durante la tesis.

Por último y de una manera muy especial a mi familia, el fundamento de mi vida. A mis padres por su esfuerzo y cariño diario, por su perseverancia en nuestra formación intelectual y humana, sin la que no seríamos quien hoy somos. A mi hermana, compañera y apoyo incondicional. A Ángel, que completa mi vida, mi gran consejero y mi mayor impulso para ser mejor persona y mejor médico. Gracias por entender y animar mi pasión por la medicina. Finalmente a mis pequeños, Lydia y Jorge, que pronto crecerán, mi motor diario para poder darles la mejor herencia que puedo ofrecerles, el ejemplo.

## ÍNDICE

### GLOMERULOPATÍA DEL TRASPLANTE Y SU RELACIÓN CON EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

<b>I. Resumen</b>	<b>7</b>
<b>II. Abstract</b>	<b>13</b>
<b>III. Introducción</b>	<b>18</b>
A. Historia del trasplante renal	19
B. Pérdida de los injertos renales a largo plazo	21
1. <i>Causas no inmunológicas de pérdida del injerto</i>	23
2. <i>Causas inmunológicas de pérdida del injerto</i>	26
C. Glomerulopatía del trasplante	30
1. <i>Evaluación histológica de la lesión</i>	30
2. <i>Diagnóstico diferencial</i>	34
3. <i>Manifestaciones clínicas</i>	34
4. <i>Mecanismos etiopatogénicos</i>	35
D. Infección del Virus de la Hepatitis C	39
1. <i>Estructura viral</i>	39
2. <i>Epidemiología y prevalencia</i>	39
3. <i>Historia natural y curso clínico en la población general</i>	41
4. <i>Historia natural y curso clínico en los pacientes trasplantados</i>	42
5. <i>Impacto de la infección crónica por VHC en el trasplante renal</i>	46
<b>IV. Hipótesis</b>	<b>49</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>51</b>
<b>VI. Material y Métodos</b>	<b>54</b>
A. Estructura de la tesis. Tipo de estudio	55
B. Fuente de datos	55
C. Población a estudiar	56
D. Muestra	59
E. Variables recogidas y definiciones	59
1. <i>Definición de glomerulopatía del trasplante</i>	67
2. <i>Definición de disfunción crónica del injerto</i>	68

F. Técnica de medida de las variables.....	69
G. Manejo estadístico de los datos.....	70
H. Estudio estadístico de los resultados.....	70
I. Tratamiento de la bibliografía.....	72
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>73</b>
A. Técnica de obtención del diagnóstico.....	74
1. <i>Proporción de pacientes GT en función del tipo de estudio.....</i>	<i>74</i>
2. <i>Proporción de pacientes con GT perdidos si el estudio fuese realizado sin microscopía electrónica.....</i>	<i>77</i>
B. Primera parte del estudio. Casos y Controles .....	79
1. <i>Estudio descriptivo de todos los pacientes con disfunción crónica del injerto. ....</i>	<i>79</i>
2. <i>Estimación del riesgo de asociación del VHC con la GT. ....</i>	<i>85</i>
3. <i>Análisis multivariante de variables aloinmunes y GT. ....</i>	<i>88</i>
4. <i>Estudio de supervivencia de los pacientes con VHC+ frente a los pacientes VHC- en una muestra con disfunción crónica del injerto. ....</i>	<i>88</i>
5. <i>Estudio de supervivencia de los pacientes con GT frente a los pacientes sin GT en una muestra con disfunción crónica del injerto. ....</i>	<i>92</i>
C. Segunda parte del estudio. Cohortes Retrospectivas .....	94
1. <i>Estudio descriptivo de todos los pacientes con GT.....</i>	<i>95</i>
2. <i>Comparación de las Cohortes de pacientes VHC+GT+ vs. VHC-GT+. ....</i>	<i>112</i>
3. <i>Estudio de supervivencia de los pacientes con GT y VHC+ frente a los pacientes con GT y VHC-. ....</i>	<i>116</i>
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>120</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>144</b>
<b>X. Bibliografía.....</b>	<b>147</b>

## ***I. RESUMEN***



**INTRODUCCIÓN:**

El trasplante renal es la terapia de elección para la mayoría de los pacientes con Enfermedad Renal Crónica en diálisis. En los pacientes que además presentan infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) es igualmente la mejor opción terapéutica, ya que su supervivencia es mayor que la de los pacientes que se mantienen en lista de espera de trasplante renal.

El virus de la hepatitis C (VHC), es un RNA virus de la cadena simple y polaridad positiva que pertenece a la familia Flaviviridae, que provoca hepatitis aguda o cronificación de la enfermedad a lo largo del tiempo, manteniéndose estabilizada o evolucionando hacia la fibrosis-cirrosis o hepatocarcinoma como principales manifestaciones hepáticas, con un importante aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes.

Afortunadamente en los últimos años, estamos asistiendo a una disminución de la prevalencia fundamentalmente en los países desarrollados, no obstante, la prevalencia del VHC en la población en diálisis, fundamentalmente en hemodiálisis, es mayor que en la población general.

Cuando se ha evaluado la supervivencia de los injertos y de los pacientes trasplantados renales seropositivos para el VHC, se objetiva en diversos estudios y metanálisis que es significativamente menor que la de los seronegativos. La razón de esta diferencia viene condicionada por la morbi-mortalidad asociada al VHC + que presentan estos pacientes, de carácter hepático y extrahepático, además de poder generar diversas lesiones de novo o de recidiva sobre el propio injerto renal entre las que destaca la glomerulonefritis membrano-proliferativa, entre otras. Recientemente se ha relacionado a la infección por el VHC con una lesión histológica de mal pronóstico llamada glomerulopatía del trasplante.

La glomerulopatía del trasplante es una lesión histológica caracterizada por presentar reduplicación de la membrana basal glomerular en ausencia de depósitos electrón-densos. Clínicamente se manifiesta con deterioro de función renal y aumento de proteinuria que puede llegar hasta el rango nefrótico. La presencia de manifestaciones clínicas es tardía con respecto al inicio de las manifestaciones histológicas evidenciadas en biopsias de protocolo analizadas con microscopía electrónica. A pesar de que se puede llegar al diagnóstico de esta lesión histológica mediante estudio por microscopía óptica, la técnica de diagnóstico óptima es la microscopía electrónica junto a la inmunofluorescencia, ya que lesiones tempranas pueden no evidenciarse en el estudio óptico y sí por estudio ultraestructural.

El diagnóstico de glomerulopatía del trasplante lleva consigo un mal pronóstico a corto plazo con un tiempo medio de pérdida del injerto renal y vuelta a diálisis desde el momento del diagnóstico menor de dos años. La etiopatogenia de esta severa lesión histológica ha sido asociada al rechazo crónico humoral. No obstante, recientemente varias publicaciones han encontrado asociación significativa con otros factores etiológicos como la microangiopatía trombótica y la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) además de propugnarse la existencia de una Glomerulopatía del Trasplante aislada, sin presencia de anticuerpos ni microtrombos ni positividad serológica para el VHC, cuyos factores etiológicos están aún por determinar.

Hasta ahora los estudios que relacionan la infección crónica del VHC con la glomerulopatía del trasplante, se han caracterizado por tener pequeños tamaños muestrales y por obtener el diagnóstico de la lesión histológica fundamentalmente por microscopía óptica, con pocas publicaciones en las que se completase el estudio por microscopía electrónica e inmunofluorescencia.

**OBJETIVOS:**

El objetivo principal del trabajo es demostrar que el VHC es un factor de riesgo para el desarrollo de glomerulopatía de trasplante en una muestra numerosa de biopsias renales analizadas por microscopía electrónica e inmunofluorescencia, y demostrar su impacto negativo en la supervivencia del injerto.

**MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se recogieron de forma retrospectiva todas las muestras de biopsias de injertos renales con el diagnóstico de disfunción crónica del injerto, realizadas entre los años 2000 y 2014 en el Hospital 12 de Octubre de Madrid y analizadas en el Servicio de Anatomía Patológica. Un total de 229. De ellas, se seleccionaron aquellas en las que se realizó estudio histológico por inmunofluorescencia y por microscopía electrónica.

El trabajo se dividió en dos fases:

- Una primera parte del estudio de casos-controles: Se recogieron 119 pacientes con disfunción crónica del injerto y se evaluó la presencia de GT y de VHC, evaluándose la existencia de asociación significativa y analizando la supervivencia de los grupos.
- Una segunda parte de estudio de cohortes retrospectivas: Se recogieron a todos los pacientes con diagnóstico de glomerulopatía del trasplante por microscopía electrónica e inmunofluorescencia, un total de 57 pacientes. Estos se dividieron en dos cohortes en función de la presencia de infección crónica por el VHC o no. Ambas cohortes se describen y analizan individualmente y entre sí. Se realizó estudio de supervivencia comparando las dos cohortes de pacientes.

El estudio estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistic Packet Social Science (SPSS) 15.

**RESULTADOS:****1. Resultados por técnica de obtención del diagnóstico.**

Analizando la prevalencia del diagnóstico de glomerulopatía del trasplante en función de si se evaluaron con microscopía óptica sólo o también con microscopía electrónica. En el grupo de pacientes de microscopía óptica encontramos por un lado 8 falsos positivos (fueron diagnosticados de GT por MO pero no se confirmó en la ME), y por otro lado, se evidenciaron 35 pacientes que fueron diagnosticados de GT por ME pero no recogidos como tales con la MO. Un 15,5% de los pacientes que presentan GT no hubiesen sido diagnosticados en nuestra población de haber obviado el estudio ultraestructural.

**2. Estudio de Casos y Controles:**

- En la muestra de 119 pacientes con disfunción crónica del injerto diagnosticada por ME se analizaron los pacientes que cumplían criterios para GT. No hubo diferencias en las características inmunológicas de los pacientes con GT y sin GT.
- Se realizó una tabla de contingencia con las variables GT si/no y VHC+ si/no, demostrando asociación significativa entre la GT y el VHC+.
- El VHC fue un factor de riesgo para desarrollar GT con una OR=7,20 (2,47-21,01).
- No se encontró asociación significativa del C4d, DSA, anti-HLA e historia de rechazo agudo, con la GT, aunque sí se evidencia al DSA como factor de riesgo para GT con una OR=1,71 (1,06-2,76). Un error tipo b por baja potencia de la muestra puede explicar la ausencia de esta asociación.
- Los pacientes con disfunción crónica del injerto y VHC+ presentaron peor supervivencia del injerto que los VHC- desde el momento del trasplante y desde la biopsia renal diagnóstica de GT de forma significativa.

- Los pacientes con disfunción crónica del injerto y GT+ presentaron peor supervivencia del injerto que los GT- desde el momento de la biopsia de forma significativa.

### **3. Estudio de Cohortes:**

Se estudiaron a todos los pacientes que presentaron diagnóstico ultraestructural de GT, un total de 57 pacientes. Se dividieron en dos cohortes en función del estado serológico para el VHC. Los dos grupos fueron similares con respecto a las características epidemiológicas, clínico-demográficas, inmunológicas, analíticas e histológicas.

- Se encontraron diferencias significativas entre los pacientes VHC+/VHC- referentes a la presencia de fibrosis intersticial y grado de atrofia tubular de las muestras, siendo mayor en los pacientes VHC+.
- Los pacientes VHC+ recibieron significativamente menos tratamiento inmunosupresor con timoglobulina o simulect en la inducción.
- Los pacientes VHC+GT+ presentaron peor supervivencia del injerto desde el momento de la biopsia que los pacientes VHC-GT+ de forma significativa.

### **CONCLUSIONES:**

La infección crónica por el VHC es un factor de riesgo para la Glomerulopatía del Trasplante diagnosticada por Microscopía Electrónica, mostrando una menor supervivencia del injerto a partir del diagnóstico por biopsia, y menor aún cuando se asocia con VHC+, siendo esta la serie más larga publicada de injertos renales con GT diagnosticada por ME.

## ***II. ABSTRACT***

**INTRODUCTION:**

Kidney transplant is the therapy of choice for most patients with chronic kidney disease on dialysis. In patients who in addition present chronic infection by hepatitis C virus (HCV) it is also the best therapeutic option, because their survival is greater than patients on the waiting list for a kidney transplant.

Hepatitis C virus (HCV) is a RNA virus of the single chain and positive polarity which belongs to the Flaviviridae family. It causes acute hepatitis or chronic disease over time, remaining stable or progressing to fibrosis-cirrhosis or hepatocellular carcinoma as main manifestations, with a significant increase in patients morbidity and mortality.

Fortunately, in recent years, we are witnessing a decline in the prevalence mainly in developed countries. However, the prevalence of HCV in the dialysis population, mainly in hemodialysis, is higher than in the general population.

To assess the graft survival and renal transplant of seropositive patients for HCV, it is objective in several studies and meta-analysis, that it is significantly lower than that of seronegative. The reason for this difference is conditioned by the morbidity and mortality associated with HCV+ presented by these patients of hepatic and extra hepatic character, besides being able to generate several new lesions or recurrence of kidney graft itself most notably membranous-proliferative glomerulonephritis, inter alia.

Recently HCV infection has been linked to a poor prognosis histological lesion called transplant glomerulopathy.

Transplant glomerulopathy (TG) is a histological lesion characterized by glomerular basement membrane reduplication in the absence of electron-dense deposits. Clinically, it is manifested by impaired renal function and increased proteinuria which can reach the nephrotic range.

The presence of clinical manifestations is belated compared with the start of the histological manifestations evidenced in protocol biopsies analyzed by electron microscopy. Although diagnosis of this histological lesion can be reached by optical microscopy study, the optimal diagnostic technique is

electron microscopy together with immunofluorescence as early lesions may not be evident in the optical study but they are by ultrastructural study.

The diagnosis of glomerular transplant implies a poor prognosis in the short term with an average time of graft loss and the return to dialysis from the moment of diagnosis in a period shorter than two years. The pathogenesis of this severe histological injury has been associated with chronic humoral rejection. However, several publications have recently found significant association with other etiological factors such as thrombotic microangiopathy and chronic infection with the hepatitis C virus (HCV) as well as be advocated the existence of a transplant glomerulopathy in isolation without alloantibodies presence without alloantibodies presence nor microthrombi nor serological positivity for HCV, whose etiological factors remain to be determined.

Up to now, studies linking chronic HCV infection with transplant glomerulopathy, have been characterized by small sample sizes and by obtaining the diagnosis of histological lesions mainly by optical microscopy, with few publications in which the study was completed by electron microscopy and immunofluorescence.

### **OBJETIVES:**

The main purpose of this work is to demonstrate that HCV is a risk factor for the development of transplant glomerulopathy in a large sample of kidney biopsies analyzed by electron microscopy and immunofluorescence, and to demonstrate its negative impact on graft survival.

### **MATERIAL AND METHODS:**

On a retrospective analysis, all biopsy samples of renal grafts with the diagnosis of chronic graft dysfunction, conducted between 2000 and 2014 in Madrid at 12 de Octubre Hospital and analyzed in the Department of Pathology were collected. 229 in total. Of these, those in which histological study was carried out by immunofluorescence and electron microscopy were selected.

The work was divided in two phases:



- Firstly, the case-control studies: Samples from 119 patients with chronic graft dysfunction were collected and the presence of HCV and GT was assessed, evaluating the existence of significant association and analyzing the survival of the groups.
- Secondly, a retrospective cohort study: Samples from patients with transplant glomerulopathy diagnosed by electron microscopy and immunofluorescence were collected. 57 patients in total. These were divided into two cohorts based on the presence of chronic HCV infection or not. Both groups are described and analyzed individually and together. Survival study was conducted comparing the two cohorts of patients.

Statistical analysis was performed using the statistical package Packet Statistic Social Science (SPSS) 15.

## RESULTS:

### 1. Results by obtaining diagnostic technique.

Analyzing the prevalence of the diagnosis of glomerulopathy of the transplant and depending on whether these were evaluated with optical microscopy only or with electron microscopy, we found that on one hand, in the group of optical microscopy, 8 false positives were detected (they were diagnosed TG by MO but It was not confirmed in the ME), and on the other hand, 35 patients who were diagnosed by ME GT were not detected as such by the MO. 15.5% of patients with GT would not have been diagnosed in our population having ignored the ultrastructural study.

### 2. Case-Control Study

- In the sample of 119 patients with chronic graft dysfunction diagnosed by ME patients who met criteria for TG were analyzed. There were no differences in the immunological characteristics of patients with and without TG.
- A contingency table was designed with the TG variables yes / no and HCV + yes / no, showing significant association between TG and HCV +.
- HCV was a risk factor for developing TG with an OR = 7.20 (2.47 to 21.01).

- No significant association was found of C4d, DSA, anti-HLA and history of acute rejection, with the TG, although it is evident the DSA as a risk factor for GT with an OR = 1.71 (1.06 to 2, 76). An error of type b for low power of the sample can explain the absence of this association.
- Patients with chronic graft dysfunction and HCV + showed significantly worse graft survival than the HCV-from the moment of transplantation and diagnostic renal biopsy of TG.

### 3. Cohort Study:

All patients who presented ultrastructural diagnosis of TG were studied, 57 in total. They were divided into two cohorts based on status for HCV. The two groups were similar regarding epidemiological, clinical and demographic, immunological analytical and histological features.

- Significant differences between HCV+ / HCV- patients concerning the presence of interstitial fibrosis and tubular atrophy degree of the samples were found, being higher in the HCV+ patients.
- TG+ HCV+ patients received significantly less immunosuppressor treatment with thymoglobulin or simulect induction.
- TG+ HCV+ patients significantly showed worse graft survival from the time of biopsy than HCV- TG+ patients.

### CONCLUSIONS:

Chronic HCV infection is a risk factor for transplant glomerulopathy diagnosed by electron microscopy, showing a lower graft survival after diagnosis by biopsy, and even lower when associated with HCV +, being this the longest published series of renal grafts with TG diagnosed by ME.

### ***III. INTRODUCCIÓN***

### III. INTRODUCCIÓN

#### A. HISTORIA DEL TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal es la terapia de elección para la mayoría de los enfermos con insuficiencia renal terminal en diálisis.<sup>1</sup> Es un procedimiento médico-quirúrgico que consiste en la implantación de un riñón de un donante, fallecido o vivo, en un receptor con insuficiencia renal, con el fin de restituir su función renal perdida. La intervención quirúrgica se debe acompañar de un tratamiento inmunosupresor individualizado para evitar el rechazo del injerto renal. El tiempo de supervivencia del injerto renal dependerá de los eventos inmunológicos que tengan lugar a lo largo de la vida del trasplante, en forma de rechazo agudo o rechazo crónico-subclínico, de factores dependientes de la propia cirugía, de la toxicidad de la medicación inmunosupresora y de la patología de base del receptor entre la que destacamos en esta tesis el estado serológico positivo o negativo del VHC en el receptor.

El primer trasplante renal realizado con éxito se llevó a cabo en Boston en el año 1954. fue llevado a cabo en el Hospital *Peter Bent Brigham* de Boston por el grupo de Merryl y Murray. Desde entonces ha existido una importante evolución, fruto del avance en las técnicas quirúrgicas, del conocimiento médico de la prevención de las enfermedades infecciosas y sobre todo del uso de modernos inmunosupresores más selectivos y con menores efectos secundarios que han conseguido que el trasplante renal sea una terapia consolidada en nuestro tiempo, de la que ya se ha beneficiado más de un millón de personas en todo el mundo. El principal problema es la escasez de órganos, que precisa de un adecuado sistema organizativo que facilite la detección de donantes y que garantice una distribución equitativa de

los órganos y disponga de medidas de control del proceso que detecte y corrija de forma eficiente los fallos en el sistema.<sup>1,2</sup>

La historia del Trasplante en España se inicia durante la década de los sesenta, cuando en 1965 cuatro médicos hacen posible los primeros trasplantes de riñón con éxito en nuestro país. Eran los doctores Gilvernet, Caralps, Alférez y Hernando. Los dos primeros del Hospital Clinic de Barcelona. Los segundos, de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. A partir de entonces se generó una actividad creciente en la donación y el trasplante, uniéndose progresivamente otros hospitales del territorio español, como el H. Marques de Valdecilla en Santander al que siguieron muchos otros hasta la actualidad.

Un hecho fundamental en los años 80 fue la aprobación por el Parlamento Democrático Español de la Ley del 27 de Octubre de 1979 en materia de trasplante de órganos y el Real decreto del 22 de Febrero de 1980 que la desarrolla. Esta ley propició de forma importante el desarrollo de los trasplantes en España. Así, el Ministerio de Sanidad dictó numerosas resoluciones relativas a la extracción de órganos y trasplantes de los hospitales autorizados. El trabajo e interés de los equipos de cirujanos y nefrólogos de los hospitales trasplantadores, consiguió grandes resultados terapéuticos.

En el año 1989 se crea la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) con una oficina en Madrid que actúa como un gran centro coordinador que ha desarrollado un sistema organizativo propio, hoy en día, modelo de referencia a nivel mundial.<sup>2</sup> Su primer Coordinador Nacional fue el Dr. Rafael Matesanz, padre del Modelo Español de Donación y Trasplante, que se ha reconocido como un modelo de alta efectividad para combatir la escasez de órganos. Este modelo se basa en una coordinación a tres niveles (nacional, regional y hospitalario), un perfil específico de los coordinadores hospitalarios, una oficina

central que da soporte a todo el proceso de donación, el reembolso de los hospitales por su actividad, esfuerzo en formación, una relación abierta con los medios de comunicación y un programa de auditoría continua de las muertes encefálicas acontecidas en las UCI de los hospitales donantes.<sup>1</sup>

En España la actividad global de la donación ha ido creciendo desde el año 1989, fundamentalmente con el establecimiento del sistema organizativo previamente descrito, con equipos de trasplante motivados y experimentados, de tal forma que el número de donantes ha aumentado progresivamente. De este modo, en el año 1989 la tasa de donación en España se situaba en los 14,3 donantes p.m.p., y en los últimos años la tasa de donación se encuentra en los 33-35 donantes p.m.p. con comunidades autónomas que superan los 40 donantes p.m.p.

En el último año 2014, El Registro Mundial de Trasplantes, que gestiona la ONT desde hace 8 años en colaboración con la OMS, eleva a 114.690 el total de trasplantes de órganos sólidos efectuados en todo el mundo. De ellos, 77.818 fueron de riñón. Se estima que estas cifras representan el 10% de la necesidad mundial de trasplante.<sup>3</sup>

En Europa las cifras sobre donación y trasplantes se mantienen estables en los últimos años, con una tasa de donación en el año 2013 de 19,5 donantes por millón de personas con un total de 9.912 donaciones de las que se realizaron 19.927 trasplantes renales en el 2013.

En Estados Unidos la tasa de donación permanece estable en los últimos años, donde oscila entre 25 y 26 donantes p.m.p.

Rusia, que ha empezado recientemente a informar al Registro Mundial de Trasplantes, con apenas 490 donantes fallecidos, presenta una tasa de donación de 2,9 p.m.p.

Los datos del Registro Mundial de Trasplantes ratifican el liderazgo

mundial de España en este campo con una tasa de 35,3 donantes p.m.p. en el año 2014, registrándose un total de 2.552 trasplantes renales.<sup>3</sup>

#### **B. PÉRDIDA DE LOS INJERTOS RENALES A LARGO PLAZO:**

Según datos de la ONT, cada trasplante renal supone una supervivencia media de 19,3 años y una ganancia media de vida de 15,3 años. En los últimos años hemos asistido a una mejoría de las terapias inmunosupresoras utilizadas para el control del rechazo renal, con un descenso en la tasa de rechazos agudos, celulares y humorales, asimismo, a la optimización de las técnicas quirúrgicas con minimización de las complicaciones, y al uso de terapias coadyuvantes que controlan la lesión crónica sobre el injerto renal. Todo ello con un seguimiento estrecho del paciente trasplantado y su injerto por parte de los especialistas de nefrología de las unidades de trasplantes, que consiguen detectar los síntomas y signos que orientan hacia la posibilidad de un deterioro, de una forma precoz con la posibilidad de instaurar terapias coadyuvantes o realizar biopsias diagnósticas que orienten en el tratamiento para alargar la supervivencia del injerto renal.

La vida media de un riñón de donante cadáver se sitúa en torno a los 15-17 años, y de unos 20 años o más cuando el riñón procede de un donante vivo no emparentado.<sup>4</sup> La duración de un trasplante puede variar, ya que depende de muchos factores como: el estado de salud previo al trasplante, la edad del receptor, el tipo de donante, la presencia de rechazo, el tipo de tratamiento o la existencia de hipertensión, diabetes o elevación del colesterol mal controlados entre otros.

Varias son las causas por las que un injerto renal se pierde a lo largo de su vida de funcionalidad; factores como el hecho de tratarse de un donante

vivo o cadáver, la edad del mismo y la calidad del órgano determinan, Influyen en la supervivencia del injerto.<sup>5</sup> Junto a ello el rechazo celular y el mediado por anticuerpos agudo o crónico como principales etiologías inmunológicas.

Destacamos causas no inmunológicas y causas inmunológicas, que pasamos a describir.

#### **1. CAUSAS NO INMUNOLÓGICAS DE PÉRDIDA DEL INJERTO:**

- **Características del donante:** los riñones procedentes de donantes añosos, presentan mayor incidencia de retraso en la función inicial del injerto, peor función renal y mayor frecuencia de rechazo agudo (datos de la UNOS). A mayor edad mayor glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis intersticial, y por tanto disminución de la función del injerto a largo plazo.<sup>8</sup>
- **Tipo de donante:** los injertos procedentes de donantes mayores, fallecidos de trauma cerebral o accidente cerebrovascular (ACV) presentan peor supervivencia que los fallecidos por otras causas.<sup>9</sup> Además, la duración de la muerte cerebral tiene efecto en la supervivencia del injerto en donantes fallecidos por ACV. El mecanismo de ello se postula serían alteraciones hemodinámicas, neurohormonales e inmunológicas generadas tras la isquemia cerebral y herniación del tronco encefálico producidos en la muerte cerebral.
- **Isquemia-reperfusión:** también se ha asociado al retraso de la función del injerto por privación de energía celular secundaria a la isquemia y al proceso inflamatorio generado tras la perfusión. Ello genera una necrosis tubular aguda (NTA) sobre el injerto renal. Recientemente está emergiendo la apoptosis como mecanismo potencial que lleva a la lesión de la célula tubular durante la isquemia. Así, en modelos experimentales se ha encontrado correlación entre apoptosis y tiempo de isquemia.<sup>10</sup>



- **Factores genéticos:** ante similares factores de riesgo, no todos los pacientes desarrollan la misma complicación sobre el injerto renal. Esto sugiere la existencia de una susceptibilidad genética. Así, las citoquinas son mediadoras de la respuesta inmune y su producción pudiera estar influenciada genéticamente. Concretamente los polimorfismos del TNF- $\alpha$ , IL 10 y TGF- $\beta$ 1 son las que más se han relacionado con la acción de estas moléculas sobre la respuesta inmunológica precoz y el pronóstico del injerto a largo plazo.<sup>6</sup> Por otro lado, diferentes polimorfismos de moléculas de adhesión (ICAM-1), factores de crecimiento endotelial y del sistema de coagulación y fibrinólisis (PAI-1, factor V Leiden y la glicoproteína IIIa/IIb) que intervienen en el daño y reparación endotelial han sido asociados también a la presencia de rechazos agudos y peor supervivencia del injerto.<sup>7</sup>
- **Factores de riesgo postrasplante:**
  - HTA en el receptor: la presencia de presión arterial sistólica o diastólica (PAS o PAD) elevadas al año del trasplante, son predictores de la supervivencia del injerto a largo plazo,<sup>11</sup> relacionándose con la progresión en el deterioro de la función renal.<sup>12</sup> Se ha postulado que el mecanismo estaría relacionado con el aumento de hipertensión glomerular en los pacientes con HTA, con aumento progresivo de la permeabilidad glomerular y posterior proteinuria con generación de un bucle de lesión glomerular.
  - Dislipemia en el receptor: se ha demostrado que produce vasculopatía en el injerto, además de asociarse a disfunción crónica del injerto.<sup>13</sup>
  - Tabaco: el tabaco reduce el flujo plasmático renal y la

fracción de filtración, probablemente mediante el aumento de la síntesis de endotelina vasoconstrictora y por reducir la generación de óxido nítrico vasodilatador. Así, en distintos estudios se ha documentado con un factor de riesgo de pérdida del injerto.<sup>14</sup>

- Tratamiento inmunosupresor con inhibidores de calcineurina: existe nefrotoxicidad crónica por el uso de tacrólimus o ciclosporina generando fibrosis intersticial en banda asociada a cambios degenerativos en las paredes de las arteriolas. Recientemente, un estudio retrospectivo de 119 pacientes con trasplante reno-pancreáticos consecutivos, mostró datos de nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina a los 10 años postrasplante.<sup>15</sup>
- **Hiperfiltración:** los trasplantes con masa nefronal reducida, presentan un riesgo de hiperfiltración y pérdida del injerto. Así el grupo de Kasiske y cols.<sup>16</sup> encuentran que riñones de donantes con índice de superficie corporal pequeña, tienen un riesgo aumentado en 43% de pérdida del injerto si son implantados en receptores de gran tamaño y de un 16% más si son implantados en receptores de tamaño medio. El principal mecanismo histopatológico de la hiperfiltración, sería una evolución hacia una glomeruloesclerosis focal.
- **Infecciones:** las infecciones por virus como el poliovirus BK virus, el Herpes virus 6 y el Citomegalovirus, pueden contribuir a la pérdida del injerto a largo plazo.<sup>17</sup> La presencia de nefropatía asociada al BK virus se estima en más de un 8% de los trasplantes renales, siendo significativa la pérdida del injerto secundaria a esta infección aislada o a su asociación a rechazo. La infección por CMV aumenta la intensidad de la inflamación

intersticial, el engrosamiento de la membrana basal capilar y la proliferación intimal vascular. Por otro lado otras infecciones como la infección por VHC,<sup>18</sup> generan mayor riesgo de pérdida de injerto entre los receptores renales seropositivos para VHC que en los seronegativos.<sup>19</sup>

- **Fibrosis y atrofia tubular de origen no especificado:** se desarrollará más adelante en la tesis.
- **Recidiva de la enfermedad primaria y glomerulonefritis de novo:** en el injerto renal puede recidivar la enfermedad que originó la insuficiencia renal crónica, frecuentemente las glomerulonefritis membrano-proliferativa, membranosa, IgA... Además de poder desarrollarse glomerulonefritis de novo en el injerto renal.<sup>88,89</sup>

## **2. CAUSAS INMUNOLÓGICAS DE PÉRDIDA DEL INJERTO**

Los factores inmunológicos son factores de riesgo a desarrollar disfunción crónica del injerto. Fundamentalmente nos referimos al sistema HLA, respuesta inmunitaria humoral.

- **Anticuerpos anti-HLA:** la importancia del sistema de histocompatibilidad humano (HLA) en la supervivencia tanto del paciente como del injerto resultaba fundamental al inicio de los trasplantes. La introducción de los inmunosupresores y su grado de efectividad, ha hecho que progresivamente se haya ido restando importancia a la compatibilidad HLA del injerto renal. No obstante, la ausencia de anticuerpos anti-HLA, específicos o no del donante, se acompaña de una menor frecuencia de rechazo crónico y una mayor supervivencia del injerto.<sup>20</sup>
- **Anticuerpos específicos contra el donante (DSA):** un reciente trabajo de 1229 receptores de trasplante renal con injerto funcionando durante al menos un año y que fueron seguidos

durante 5 años encontró que la presencia de Ac anti-HLA, tanto específicos del donante como no, se asocia a una menor supervivencia del injerto, una peor función renal y a proteinuria.<sup>21</sup>

- **Grado de histocompatibilidad:** los receptores de un trasplante renal de donantes vivos con una pobre compatibilidad HLA presentan unos resultados a largo plazo equivalentes a los de los receptores que han recibido un injerto de un donante vivo haploindéntico.<sup>22</sup> Es decir, aunque la identidad HLA siguen siendo un factor esencial en el medio-largo plazo, se considera más importante la calidad del aloinjerto y el manejo peri-operativo.<sup>23</sup>
- **Rechazo agudo:** el factor inmunológico más relacionado con riesgo de pérdida del injerto a largo plazo es una elevada tasa de rechazos agudos.<sup>24</sup> Esta asociación es más estrecha en los casos de rechazo agudo humoral y rechazo agudo tardío. Incluso, el rechazo subclínico, la forma de rechazo agudo sin deterioro funcional, contribuyen a la generación de disfunción crónica del injerto asociándose a una menor tasa de filtración glomerular a los 3 meses.
- **Rechazo crónico humoral** (definido más adelante).

Todas estas causas pueden generar la pérdida del injerto renal a lo largo de su vida de funcionalidad, de forma que genera una lesión histológica que venimos a denominar durante toda la tesis como **Disfunción Crónica del Injerto** renal. La lesión histológica responsable de la disfunción crónica precede en meses o incluso años al deterioro de la función renal o a la proteinuria.

La denominación de esta lesión crónica ha sufrido varios cambios a lo largo de estos últimos años a tenor de las modificaciones en la Clasificación de Banff.

Con el objeto de estandarizar la interpretación de la biopsia del trasplante renal y para poder establecer una guía terapéutica, se desarrolló la Clasificación de Banff cuyo origen fue en el año 1991 en Banff (Canadá), redefiniéndose posteriormente en siguientes reuniones en años posteriores. Este hecho origina que la nomenclatura histológica que define la disfunción crónica del injerto ha ido variando con el tiempo.

El grupo de Banff 97 Working Classification on Renal Allograft Pathology<sup>25</sup>, define una biopsia adecuada la que contiene dos muestras de tejido cortical en las que hay un total de 10 glomérulos y dos arterias para el estudio por microscopía óptica. Adicionalmente, tres o cuatro glomérulos para inmunofluorescencia (IM) y uno o dos glomérulos para microscopio electrónico son las muestras adecuadas para cada una de las referidas modalidades.

Hasta la primera reunión de Banff 1991 se usó el término **Rechazo Crónico** para describir la existencia de lesiones crónicas en las biopsias de injertos renales. Se consideró en esta reunión que el término rechazo crónico hacía referencia a la lesión histológica generada por respuesta aloinmune, y por tanto se cambió por el término **Nefropatía crónica del Injerto (NCI)** que se definió como una entidad histológica caracterizada por la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular con o sin engrosamiento de la íntima arterial y cuyos factores de riesgo fueron la edad del donante, la necrosis tubular aguda y el rechazo agudo.

Posteriormente se consideró muy inespecífico el término NCI pudiendo ser resultado de muchas patologías (desde la edad del donante, al rechazo agudo antes de la biopsia, como a nefrotoxicidad o nefropatía por el virus el polioma) y en la reunión de Banff 2005 se definió más estrictamente comenzándose a utilizar el término Rechazo Crónico Humoral y se creó una nueva categoría diagnóstica, la Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular de origen incierto<sup>25</sup>.

Así las lesiones crónicas del injerto renal se dividieron en cuatro apartados bien definidos.<sup>25,26</sup>

- a) **Rechazo crónico humoral:** se caracteriza morfológicamente por la presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares con al menos una de las siguientes lesiones histológicas sugestivas: Glomerulopatía del trasplante (la lesión más característica) acompañada o no de glomerulitis, fibrosis-engrosamiento de la íntima en las arterias, fibrosis intersticial y atrofia tubular. El cuadro clínico patológico del rechazo crónico humoral se completaría con la presencia de anticuerpos anti-HLA específicos del donante (DSA).
- b) **Rechazo crónico mediado por Linfocitos T:** se caracteriza por la fibrosis de la íntima con infiltración de células mononucleares y formación de neo-intima. La llamada “arteriopatía crónica del injerto”.
- c) **Fibrosis intersticial y atrofia tubular (FIAT):** se especifica de esta manera cuando no existe ninguna etiología específica.
- d) **Cambios no relacionados con rechazo agudo o crónico:** aquellas biopsias que presentaban lesión crónica no inmunológicas, sin C4d ni DSA.
  - a. FIAT por nefrotoxicidad por anticalcineurínicos.
  - b. FIAT por hipertensión arterial.
  - c. Nefropatía viral, fundamentalmente por la nefropatía por virus BK.
  - d. Pielonefritis bacteriana.

Otro término acuñado es el de **Rechazo Humoral Subclínico** para pacientes con lesiones histológicas sugestivas y C4d + evidenciadas con biopsias de seguimiento en ausencia de manifestaciones clínicas. Se ve más frecuentemente en pacientes hipersensibilizados, y se relaciona con pacientes que posteriormente evolucionan a al deterioro de la Cr o la proteinuria los meses o los años.<sup>27</sup>

### **C. GLOMERULOPATÍA DEL TRASPLANTE:**

El uso del microscopio electrónico (ME) para el diagnóstico certero y precoz de la glomerulopatía del trasplante (GT) es esencial.<sup>28</sup>

De forma general, se describen como indicaciones comunes, para el uso del microscopio electrónico en las biopsias de los injertos renales, la GT, la recurrencia de la enfermedad primaria, la glomerulonefritis de novo, la enfermedad relativa al donante y la infección o el diagnóstico no concluyente por MO y/o IM.<sup>29</sup>

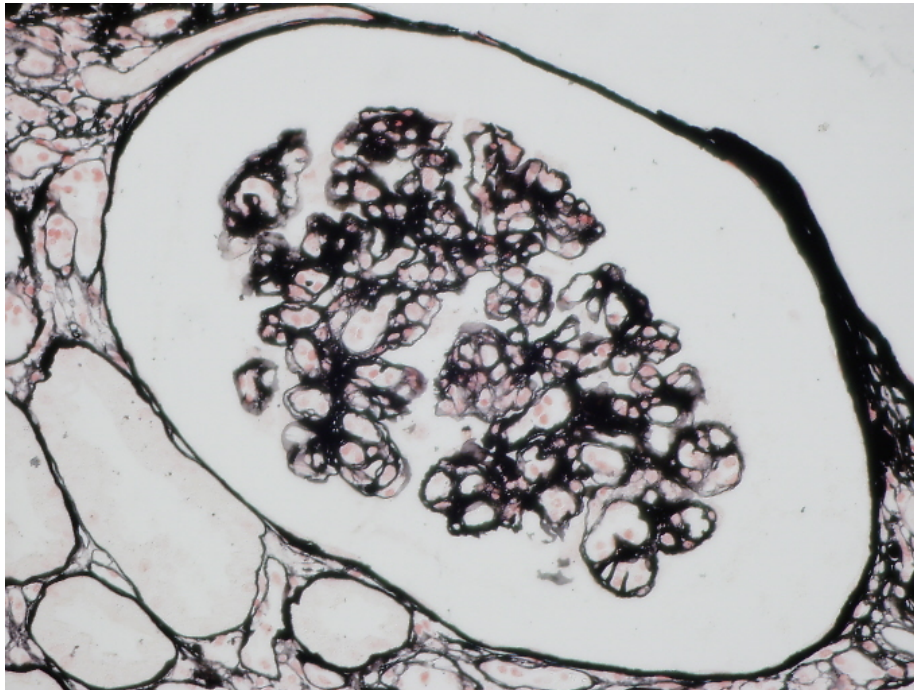
La GT es una lesión caracterizada histológicamente por representar un patrón diferenciado de lesión crónica del injerto que comprende los capilares del injerto renal. Según Gloor, la GT afecta aproximadamente al 20% de los injertos a los 5 años del trasplante<sup>30</sup> y es la principal causa de pérdida tardía del injerto renal.

El diagnóstico de la GT es estrictamente histológico mediante toma de muestra y análisis de la biopsia renal. Se caracteriza por la presencia de doble contorno en los estudios por microscopía óptica y en los estudios por microscopía electrónica por reduplicación de la membrana basal glomerular, en ausencia de depósitos electron-densos. Existen otras lesiones histológicas en los injertos renales con las que hacer diagnóstico diferencial con la GT; TMA, isquemia y glomerulonefritis crónicas fundamentalmente.<sup>31</sup> Por ello, la GT es una de las indicaciones comunes del estudio con ME.<sup>29</sup>

#### **1. Evaluación histológica de la lesión:**

En el microscopio óptico se diagnostica con la presencia de doble contorno en la membrana basal glomerular (MBG), visualizado en la tinción de plata metelamina, y a menudo acompañado por expansión de la matriz

mesangial con o sin presencia de hiper celularidad mesangial<sup>32</sup> (*Imagen 1*). La afectación glomerular puede ser focal o difusa. Según los criterios de Banff, la severidad de la lesión es mayor en función de mayor número de glomérulos afectados. Así, la presencia de doble contorno en <10% de los capilares glomerulares (cg0), de 10%-25% (cg1), de 26%-50% (cg2) y >50% (cg3).<sup>25</sup>



*Imagen 1. MO: imagen de doble contorno en la tinción de plata metelamina.  
(Gentileza Dr. Martínez).*

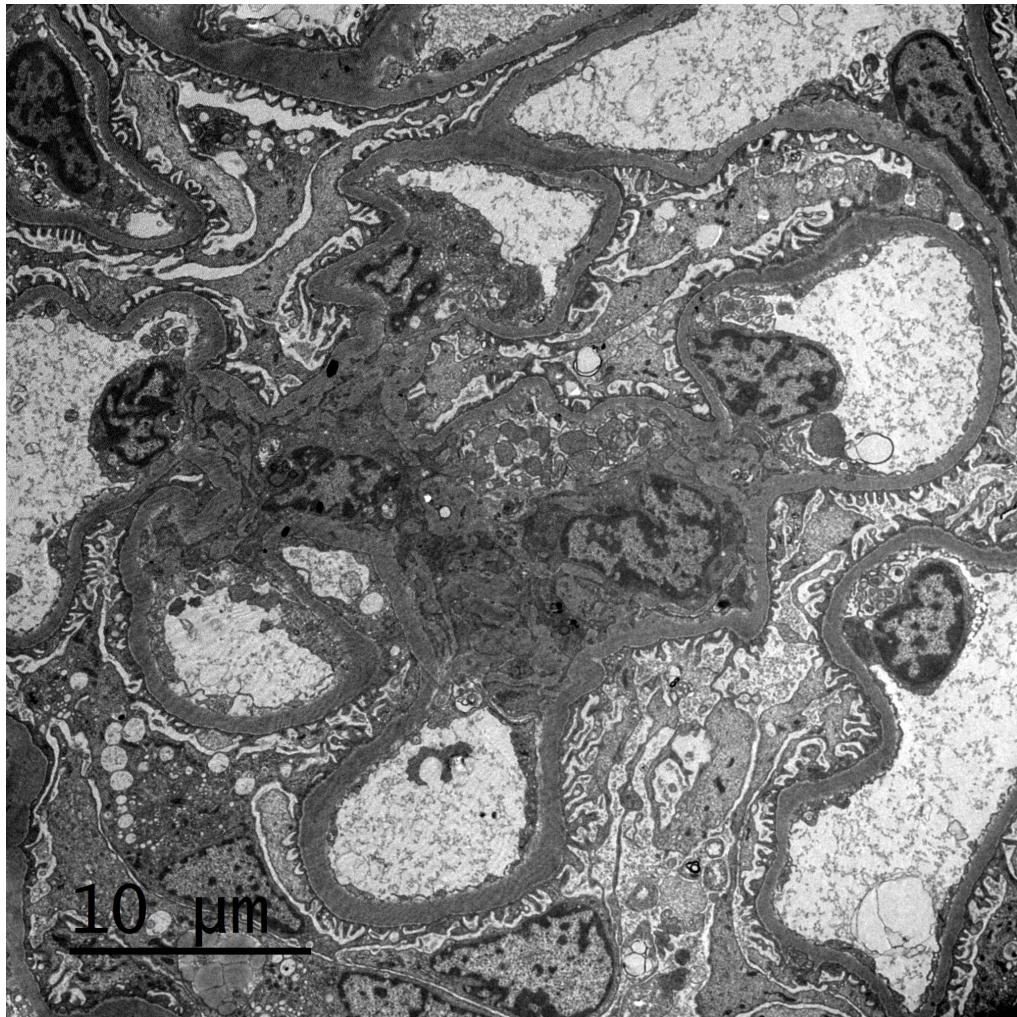
Los datos de actividad al MO se evidencian con la presencia de depósitos de C4d y datos de capilaritis y glomerulitis. Otro signo de actividad es la presencia de fibrina y de microtrombos en las luces de los capilares glomerulares.<sup>26</sup>

En la Inmunofluorescencia destaca la ausencia de depósitos electrón-densos. En la inmunohistoquímica puede existir presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares y glomerulares cuando la GT se asocia a RCH.

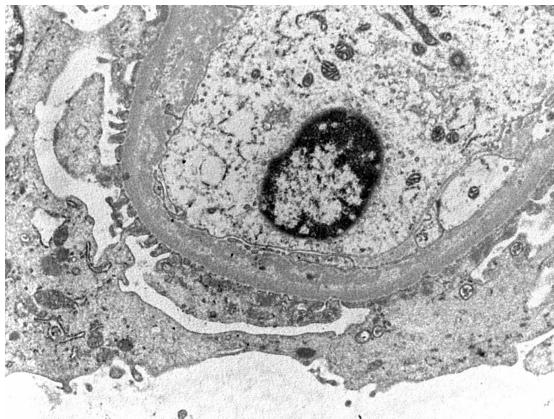


En el estudio con ME las características que se encuentran en la GT son las siguientes.<sup>27,29</sup>

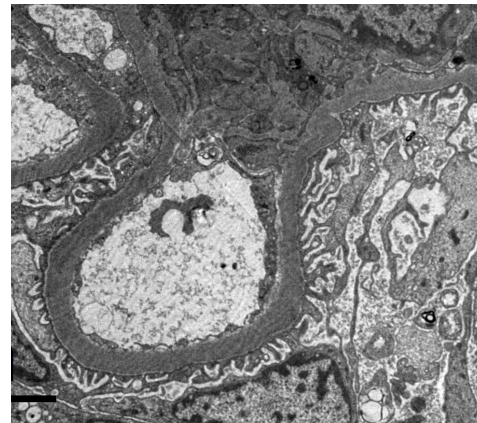
1. Reduplicación o multilaminación de la GMB con o sin interposición mesangial. La reduplicación e interposición mesangial pueden ser circunferenciales en casos severos. (*Imagen 2*).
2. Ausencia de depósitos inmunes (electrón-densos) en glomérulos no esclerosados.
3. Zonas subendoteliales ampliadas electrón-lucientes.
4. Reduplicación de la lamina basal de los capilares peritubulares (capilaropatía del trasplante). Este hallazgo en el contexto clínico apropiado de proteinuria y aumento de creatinina está considerado como un marcador altamente predictivo de GT.
5. Fusión de los podocitos. El grado del mismo está generalmente en sincronía con el grado de proteinuria. Puede ser severo en casos de GT avanzada.<sup>28</sup>
6. Hipertrofia endotelial y disminución de la fenestración endotelial en el glomérulo y de los capilares peritubulares. El grado de la afectación endotelial está generalmente en sincronía con la severidad de la glomerulopatía del trasplante.<sup>33,34</sup>
7. Expansión de la matriz mesangial.
8. Glomerulitis



*ME: capilares glomerulares normales, con la membrana basal sin reduplicación y la presencia de interdigitación de los podocitos y fenestración de las células endoteliales. Ausencia de depósitos electron-densos.*



*Imágen 2: Doble contorno de la membrana basal glomerular. Ensanchamiento del espacio subendotelial.*



*Asa capilar normal.*

*Imágenes por gentileza Dr. Martínez.*

La presencia de reduplicación de la membrana basal glomerular en el ME en ausencia de depósitos electrón-densos es característica de la GT, y se evidencia en estadios precoces en los que al MO no se ve aún la imagen característica de doble contorno.<sup>34</sup>

La reduplicación de la lámina basal de los capilares peritubulares en un contexto clínico apropiado de proteinuria y elevación de la creatinina, es considerado un alto marcador predictivo de GT.<sup>29</sup>

## **2. Diagnostico Diferencial de la Glomerulopatía del Trasplante:**

En los pacientes con proteinuria, el ME es un importante método complementario al MO y IF para distinguir la GT de la glomerulonefritis de novo y de recidiva.<sup>28</sup> Además, el ME puede ayudar a diferenciar GT de entidades de similar apariencia con el MO como la GNMP, nefritis lúpica, micoangiopatía trombótica (MAT) e isquemia, que pueden mostrarse en el MO de forma variable con un adelgazamiento de la membrana basal glomerular (MBG), doble contorno de la MBG y expansión mesangial.<sup>35</sup> No sólo eso, sino que el ME puede demostrar cambios indicativos de la GT antes de que sean evidentes en el MO.<sup>34</sup>

En el caso de MAT, aún con el uso del ME puede ser indistinguible, por lo que es necesaria la correlación clínica para diferenciar los casos de GT de los de MAT secundaria a síndrome hemolítico urémico y síndrome antifosfolípido.<sup>32</sup>

## **3. Manifestaciones clínicas de la Glomerulopatía del Trasplante:**

Clínicamente se manifiesta como un aumento progresivo de la creatinina y de la proteinuria que puede llegar hasta el rango nefrótico. Este deterioro puede ser lento, por lo que a menudo puede ser infradiagnosticada al esperar

para realizar una biopsia del injerto, a un deterioro mayor. Así lo confirma el estudio de Gloor et al.<sup>36</sup> de la Clínica Mayo que encontró que casi la mitad de los injertos con GT fueron subclínicos y detectados en biopsias de protocolo.

#### **4. Mecanismos etiopatogénicos de la Glomerulopatía del Trasplante:**

Aunque la GT es una entidad conocida hace más de 40 años, últimamente se ha avanzado significativamente en su conocimiento. La evidencia actual soporta que la GT es una entidad única desde el punto de vista patológico, y una entidad distinta desde el punto de vista patogénico de las otras formas de lesión crónica del injerto.

Inicialmente se consideró que la GT se manifestaba fundamentalmente por los efectos del rechazo crónico humoral (con presencia de tinción de C4d en la muestra y anticuerpos donante específicos (DSA) en suero).<sup>37,26</sup>

El grupo de Canadá revisó 53 injertos renales con diagnóstico de GT, encontrando en un 73% evidencia de daño mediado por anticuerpos con C4d+ y/o anti-HLA+. La incidencia en su estudio de C4d fue menor que la de los anti-HLA circulantes concluyendo que la ausencia de C4d no excluye necesariamente un daño glomerular mediado por anticuerpos. No evidenciaron presencia de anti-HLA en un 27% de los casos.

No obstante, varias publicaciones presentaron pacientes con GT con importante prevalencia de DSA negativos y C4d negativos, considerando que no se podía descartar la existencia de un mecanismo alternativo al rechazo crónico humoral, generador de la misma lesión histológica.<sup>38,39</sup>

Por ello, en publicaciones más recientes<sup>30,40,41</sup> se afirma que la GT es el resultado de una o varias etiologías, diferenciando las mediadas por aloanticuerpos y las no mediadas por aloanticuerpos.

**a) GT mediada por aloanticuerpos:**

El grupo de consenso internacional de Banff<sup>37</sup> clasificó la GT como un rechazo mediado por anticuerpos (rechazo crónico humoral) cuando el patrón de doble contorno de la membrana basal de los capilares glomerulares se acompañaba de DSA y de depósito lineal o difuso de C4d en los capilares peritubulares.<sup>42</sup>

La presencia de C4d+ en los capilares peritubulares se asocia con un 95% de especificidad a la presencia de DSA, fundamentalmente anti-HLA II,<sup>43,44</sup> por lo que el hallazgo de C4d confirmaría la presencia de DSA actuando en el endotelio del injerto renal. No obstante, en publicaciones recientes se evidencian pacientes en los que existe presencia de DSA sin C4d y viceversa.<sup>55</sup>

El grupo de Sis and Co-workers<sup>46</sup> publicaron series de pacientes con GT+ con asociación con DSA pero no con C4d+. Igual situación demostró Loupy et al.<sup>47</sup> en injertos con glomerulitis y/o capilaritis peritubular con C4d-. Para explicar la presencia de DSA en ausencia de C4d+, se ha propugnado que la exposición crónica a niveles bajos de DSA podrían generar lesión en el endotelio debido a un grado de activación del complemento pero que fuera insuficiente para resultar en la detección del C4d+ por inmunohistoquímica.<sup>30,46</sup>

Continuando en esta línea de investigación pero con diferencias en el resultado, el grupo de Akalin et al<sup>48</sup> mostró en su serie que el 60% de los casos de GT+ se desarrollaron en la ausencia de DSA con C4d+, planteando la posibilidad de un mecanismo alternativo.

**b) GT sin aloanticuerpos:**

Existen varias publicaciones de causas diferentes al rechazo crónico humoral, que generarían la GT, y en las que no se encontró la presencia de aloanticuerpos.<sup>38,39</sup> Estos datos sugieren que cuando la presencia de C4d en los capilares peritubulares es indetectable, etiologías diferentes al rechazo

crónico humoral, pudieran ser las responsables de la GT. Entre ellas destacamos:

1. **Microangiopatía trombótica:** La MAT se caracteriza con daño endotelial severo causado por un grupo heterogéneo de enfermedades que resultan en trombosis de pequeños vasos. En una afectación intensa y crónica, puede producir doubles contornos, siendo difícil diferencial la GT de las secuelas de la MAT, esto sugiere que son entidades similares y/o que ambas se solapan. En el estudio de Baid-Agrawal et al.<sup>40</sup> publicaron que muchos de sus pacientes con GT y VHC+, también tenían MAT, especulando que estas dos condiciones se relacionaban con la presencia de anticuerpos anticardiolipina. Por otro lado, la MAT de novo se ha publicado en un 3%-14% de los injertos renales y comúnmente se ha asociado a Rechazo Humoral Agudo y a toxicidad por anticalcineurínicos.<sup>49</sup>

En resumen, cualquier entidad que genere MAT tras el trasplante renal, potencialmente pudiera general GT.

2. **Infección crónica por VHC+:** en unos pocos estudios casos-control y de cohortes publicados en distintos centros de trasplante renal, se ha encontrado una asociación independiente entre la infección crónica del VHC+ y la GT tras el trasplante renal.<sup>40,30</sup> Cosio et al.<sup>50</sup> comunicaron un aumento de la prevalencia del VHC en injertos renales con glomerulitis (29%) y GT (33%) comparado con injertos renales sin VHC (1,3%). Gloor et al.<sup>30</sup> en su muestra con una baja prevalencia de VHC+, encontró que el VHC fue un factor de riesgo para la GT tras ajustarse a rechazo y antígenos anti-HLA. Recientemente, el estudio de Agrawal et al. muestra en una serie de 25 pacientes con GT, una mayor prevalencia de VHC+ comparado con controles con nefrotoxicidad por

anticalcineurínicos (36% frente a 7%), presentando los pacientes GT+VHC+ una peor supervivencia del injerto independientemente del C4d y de la MAT.<sup>40</sup>

En los estos estudios se especula sobre un mecanismo de lesión endotelial que generaría la infección por el VHC y que sería diferente a la generada por los DSA. Esta pudiera consistir en una lesión por inmuno-complejos y/o anticuerpos antifosfolípidos que generasen microtrombosis, ya que es conocido que el VHC puede inducir autoanticuerpos (incluyendo anticardiolipinas). Apoyando esta hipótesis se encontraron trombos en la microvasculatura glomerular en un 56% de los pacientes con GT+VHC+, y sólo en un 19% de los pacientes GT+VHC-.

En los estudios referidos, las muestras no se confirmaron en todos los casos con IF y/o ME, por lo que no se pudieron diferenciar con claridad de los casos de GNMP, con similar lesión, y que se asocian con el VHC tanto en los riñones nativos como en los trasplantados.

Nuestro trabajo, elimina este sesgo de diagnóstico, intentando encontrar una asociación significativa entre el VHC y GT en muestras diagnosticadas por microscopía electrónica.

3. **GT aislada:** aquella sobre la que no se ha demostrado factor etiopatogénico.

#### **D. INFECCIÓN DEL VIRUS DE HEPATITIS C:**

La Organización Mundial de la Salud, estima que hay aproximadamente 180 millones de personas con infección crónica por VHC; se diagnostican 4.1 millones de casos nuevos anualmente y más de 350.000 personas mueren cada año de enfermedad hepática relacionada con el VHC.<sup>51,52</sup> Sólo en Estados Unidos, de acuerdo a los datos aportados por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, se estima que anualmente aparecen 19 mil casos nuevos y que más de 3.4 millones de personas están infectadas con VHC.<sup>53</sup>

En la mayoría de pacientes, el VHC causa una enfermedad hepática crónica lentamente progresiva que puede llevar a cirrosis, cáncer hepático o a la necesidad de trasplante hepático. No en vano, el VHC se ha convertido en la primera causa de trasplante hepático en adultos del mundo occidental.<sup>53</sup> Igualmente, la infección por el VHC es la principal causa de enfermedad hepática crónica en los pacientes trasplantados renales.<sup>54</sup>

##### **1. Estructura viral:**

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus ARN (ácido ribonucleico) de cadena simple y polaridad positiva que pertenece a la familia Flaviviridae.<sup>55</sup> Estaba incluido en las infecciones conocidas como hepatitis no A no B hasta que en 1989 fue secuenciado y fue formalmente denominado como hepatitis C por Choo y cols.<sup>56</sup>

##### **2. Epidemiología y Prevalencia:**

Más del 60% de casos de infección por VHC se presentan en hombres con una distribución variable de los casos teniendo en cuenta aspectos socio económicos.

La transmisión ocurre fundamentalmente por vía sanguínea. La mayoría de los receptores de trasplante adquieren la infección VHC durante el

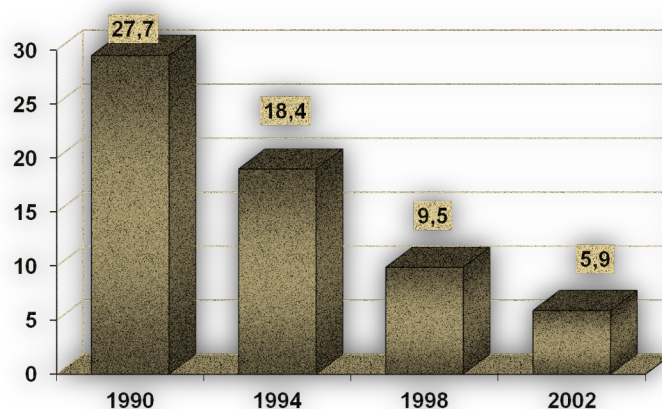


tratamiento en diálisis<sup>57,58</sup> y más frecuentemente a través de la transfusión sanguínea o el trasplante de órganos.

La prevalencia de la infección del VHC en los pacientes con enfermedad renal crónica es mayor que en la población general. En los pacientes en diálisis esta prevalencia estimada por ELISA, varía entre el 3%-10% en países desarrollados y entre un 15% y 75% en países en desarrollo.<sup>57,59</sup> La variación en esta prevalencia depende de varios factores; el hospital o clínica médica donde el paciente es tratado, la etnia, el área geográfica, el tipo y la duración de diálisis, el número de órganos trasplantados, número de transfusiones, la reactividad para el antígeno del VHB y el uso de drogas intravenosas.<sup>57</sup>

El descenso en la frecuencia del contagio del VHC durante la diálisis<sup>60</sup> ha generado un descenso en la tasa de pacientes con infección crónica por VHC en los pacientes trasplantados renales. En el estudio de Morales et al. se evidenció un progresivo y marcado descenso en la prevalencia de la infección España desde el 29,5% en 1990 al 10% en 1998.<sup>61</sup> El uso y creación de protocolos en las medidas de higiene y estrategias relacionadas ha descendido la tasa de transmisión y en consecuencia la prevalencia de la infección VHC.

En la siguiente figura evidenciamos la evolución de la prevalencia del VHC en los últimos años en nuestro país: (*Figura 1*):



*Figura 1*

Morales JM, et al , NDT, 2010

El paciente con infección crónica por el VHC no sólo puede ser causa de enfermedad renal crónica, sino que también contribuye a un aumento de la morbilidad y la mortalidad en los pacientes con enfermedad renal crónica por otras etiologías que estuvieran en situación de estabilidad. Así, el impacto de la infección por VHC en el trasplante renal, comienza con las consecuencias de esta infección ya durante el periodo estancia en lista de espera de trasplante renal.

### **3.Historia natural y curso clínico en la población general:**

En la población general los pacientes con infección crónica por VHC presentan más riesgo de enfermedad hepática (desarrollo de hepatitis crónica activa, cirrosis y hepatocarcinoma) y extrahepática, con posibilidad de generar patologías entre las que destacan la glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), crioglobulinemia mixta esencial (CME) y la porfiria cutánea tarda. Otras patologías extrahepáticas relacionadas con la infección crónica por VHC son la tiroiditis autoinmune, las ulceraciones corneales de Mooren, el liquen plano y la sialadenitis linfocitaria (creo que en un artículo de los fotocopiados)

En cuanto a la afectación propiamente renal, el VHC+ se ha asociado, como decíamos al desarrollo de diversas enfermedades renales, destacando las glomerulonefritis crónicas con el desarrollo de glomerulonefritis membrano proliferativa (GNMP) fundamentalmente, pero también con la glomerulonefritis membranosa (GNM), con la glomeruloesclerosis segmentaria y focal (GESyF), Nefropatía IgA, glomerulonefritis fibrilar inmunotactoide, microangiopatía trombótica y glomerulonefritis postrasplante renal.

En los pacientes con infección crónica por VHC+ el trasplante renal está también considerado como la mejor opción terapéutica<sup>61-64</sup> con una menor mortalidad de los pacientes VHC+ que fueron trasplantados frente a los que permanecieron en diálisis o en la lista de espera de trasplante renal.<sup>65</sup> No

obstante, son muchas las consecuencias clínicas que genera esta infección también en el paciente e injerto renal trasplantado.<sup>66,67</sup> De modo que a pesar de ser el trasplante la mejor opción terapéutica, existe menor supervivencia del injerto renal comparado con los pacientes trasplantados serológicamente negativos para el VHC.

#### **4. Historia natural y curso clínico en los pacientes trasplantados:**

El curso de la infección del VHC+ tras el trasplante renal habitualmente progresa sin complicaciones inmediatas, aunque las alteraciones clínicas y patológicas pueden manifestarse a lo largo del tiempo.<sup>68</sup>

##### **1. Complicaciones hepáticas:**

La infección crónica por VHC es la principal causa de enfermedad hepática tras el trasplante y se asocia a un aumento en la mortalidad.<sup>69</sup> La hepatitis crónica y sus secuelas son las principales formas de enfermedad hepática. Además se ha descrito en 1,5% de los pacientes con infección por VHC, una forma severa de enfermedad hepática llamada Hepatitis Colestásica Fibrosante, caracterizada por colestasis severa y rápida progresión al fallo hepático.

Un total de 20-51% con infección VHC+ RNA+ presentan función hepática normal, aunque esta normalidad en la situación clínica no necesariamente implica una ausencia de lesión en la histología hepática.<sup>57,70,71</sup>

En cuanto a la progresión de la enfermedad hepática crónica en estos pacientes, determinada por la elevación de transaminasas en más de 6 meses, depende de la severidad de la enfermedad hepática antes del trasplante, de la lesión histológica hepática previa, de la infección concomitante con el VHC del tiempo después del trasplante renal y del tratamiento inmunosupresor elegido

para el trasplante cuyo efecto ha sido revisado recientemente.<sup>72</sup> El tiempo de progresión a la fibrosis hepática es controvertido. Mientras unos estudios muestran que existe una rápida progresión,<sup>57</sup> otros encuentran que la infección por el VHC no genera una influencia negativa en la histología hepática hasta un largo plazo de tiempo,<sup>73,74</sup> así en una serie de pacientes trasplantados VHC+ que fueron seguidos en el tiempo con biopsias hepáticas, el 77% permanecían estables o incluso se encontraba una mejoría en su histología hepática en un periodo de 20 años.<sup>75</sup>

La mortalidad debida a enfermedad hepática en el paciente trasplantado renal con infección crónica por VHC, generada por cirrosis o hepatocarcinoma, es mayor que en los pacientes seronegativos.<sup>57</sup> Un seguimiento ecográfico cada 6 meses postrasplante en los pacientes que desarrollan cirrosis hepática por VHC es necesario.

## **2. Complicaciones extrahepáticas en el trasplantado renal VHC+. Patología extrarrenal:**

La infección por el VHC también genera en el paciente trasplantado renal patología extrahepática, que influirá directa o indirectamente en la supervivencia del injerto y del paciente y que pasamos a detallar:

- a) Diabetes: existe riesgo aumentado de desarrollo de diabetes tras el trasplante renal en estos pacientes, fundamentalmente por resistencia a la insulina causada por la inhibición del VHC de la regulación de la insulina en el hígado<sup>57</sup> (NODAT: new-onset diabetes after renal transpantation). La asociación entre VHC y NODAT está también influenciada por la presencia de factores de riesgo tradicionales, como obesidad, edad, etnia y síndrome metabólico.<sup>76</sup> Así, también el uso de tacrólimus en estos pacientes aumenta la incidencia de NODAT.<sup>19</sup> El desarrollo de NODAT puede explicar una peor supervivencia del injerto

renal en los pacientes trasplantados con VHC+ y un mayor riesgo de mortalidad que los pacientes que no la desarrollaron.<sup>57</sup>

- b) Infecciones: existe un aumento de la frecuencia de infecciones evidente en los primeros 6 meses postrasplante renal, periodo en el que el efecto de la inmunosupresión es mayor.<sup>75,77,78</sup> Además la inmunodeficiencia que confiere la propia infección VHC pudiera explicar la susceptibilidad de estos pacientes en presentar infecciones secundarias.<sup>79</sup> La infección es la segunda causa de muerte después de la enfermedad cardiovascular en estos pacientes.<sup>80</sup>

Sobre este punto también existe controversia ya que, en un estudio multicéntrico prospectivo,<sup>81</sup> no se encontraron diferencias en la incidencia de infecciones entre los pacientes VHC+ y VHC-. Por otro lado, en un estudio caso control retrospectivo, la infección por VHC demostró ser un factor de riesgo independiente para el *Mycobacterium tuberculosis* tras el trasplante renal.<sup>82</sup>

- c) Neoplasia extrahepática: la infección por crónica por VHC en pacientes trasplantados pudiera jugar un papel en la patogénesis de los trastornos linfoproliferativos y otras neoplasias hematológicas como el mieloma,<sup>83,84</sup> describiéndose en datos de Australia y Nueva Zelanda como la tercera causa de muerte en pacientes trasplantados con VHC+.

### **3. Complicaciones extrahepáticas en el trasplantado renal VHC+.**

#### **Patología renal:**

- a) Rechazo agudo: el impacto de la infección crónica VHC+ en el rechazo del injerto renal es controvertido. Algunos grupos han encontrado un descenso en la tasa de rechazo agudo en estos pacientes.<sup>61</sup> Por el contrario, otros han encontrado una similar o incluso mayor incidencia de rechazo agudo.<sup>80,87</sup> Correll et al publicaron que la

infección por VHC+ induce un estado de inmunodeficiencia en el paciente trasplantado basado en la reducción de la tasa de linfocitos T helper y a una alteración en su respuesta proliferativa. Estas alteraciones podrían explicar una disminución en la incidencia del RA que de hecho se ha publicado en varios grupos: de tal forma que Roth et al describieron una tasa de RA del 14,5% en pacientes con infección crónica por VHC+. En controversia con esto, otras series han encontrado una similar o incluso mayor incidencia de RA en los pacientes VHC+<sup>57</sup>. Es preciso reconocer para explicar esta controversia, que las variables como tiempo en diálisis, trasplante previo, número de transfusiones se consideran también factores de riesgo para RA por la carga inmunológica que conllevan en sí mismas, lo que unido al VHC+, explicaría en estos casos una mayor prevalencia de RA que la esperada en un paciente VHC+ con la respuesta inmune alterada. De hecho en el Estudio Nacional Español del Virus C, se evidencia mayor RA en los pacientes VHC+ porque hay un mayor número de segundos trasplantes e hiperinmunizados.

- b) Glomerulonefritis de novo o de recidiva: las lesiones glomerulares se han descrito en riñones nativos y trasplantados de pacientes con infección por VHC+.<sup>57,70,88-90</sup> Así la GNMP crioglobulinémica o no crioglobulinémica, es la más frecuentemente asociada, seguida de la GNM. Otras son la MAT asociada a anticuerpos anticardiolipina, glomerulopatía del trasplante aguda y glomerulopatía del trasplante crónica.<sup>91,92</sup>

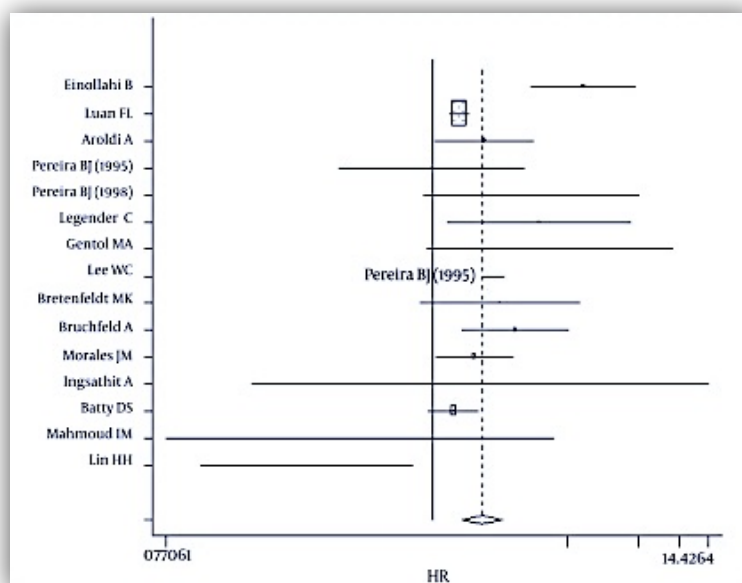
La patogénesis del VHC asociado a GN se explicaría por el depósito de inmunocomplejos que contienen RNA del VHC en los glomérulos, lo que ocurre paradójicamente a pesar del tratamiento

inmunosupresor. Esto podría explicarse por una alteración en el ratio antígeno anticuerpo de los inmunocomplejos debido a una elevación de la tasa viral asociada a la inmunosupresión del paciente. Esto aumentaría el depósito de los inmunocomplejos en el riñón generando la GN mediada por inmunocomplejos.<sup>19</sup>

- c) Glomerulopatía del trasplante: la GT es una lesión glomerular específica de los injertos renales, caracterizada por la duplicación/multilaminación de la membrana basal glomerular.<sup>31,32,93</sup> Recientes estudios han mostrado que la incidencia de GT es mayor de la esperada, afectando a al 4% de los trasplantes convencionales en el primer año postrasplante, y progresivamente aumentando hasta un 20% a los 5 años.<sup>30,32</sup> El pronóstico es malo, con una pérdida del injerto renal a corto plazo en un 40-70% de los casos.<sup>32,40</sup> Se ha asociado con el rechazo crónico humoral, la MAT y recientemente se ha sugerido también su relación con la infección por el VHC+.<sup>57</sup>

#### **5. Impacto de la infección crónica por VHC en el trasplante renal:**

La mayoría de los estudios con seguimiento a largo plazo encontraron que la infección crónica por VHC es un factor de riesgo independiente para una peor supervivencia del paciente y del injerto, confirmado con dos metanálisis recientes.<sup>94-97</sup> (*Figura 2*).



*Figura 2. Metanálisis: Rostami Z et al. Hepat Mon 2011; 11: 247-254<sup>96</sup>*

La mortalidad relacionada a enfermedad hepática (cirrosis hepática y hepatocarcinoma) fue, como se esperaba, más elevada de forma significativa en los pacientes trasplantados VHC+, con un Hazard ratio de 22,1 (95% CI 6,99-121,84) en el estudio de Scott et al.<sup>98</sup> Similares resultados encontró el grupo de Fabrizi et al.<sup>94</sup> Asimismo, Scott et al encontraron también que los pacientes trasplantados con VHC+ presentaban mayor mortalidad de etiología cardiovascular de forma significativa que los VHC-, con un Hazard ratio de 2,74 (95% CI 1,61-4,65). Estos datos fueron confirmados posteriormente en un metanálisis.<sup>94</sup> El elevado riesgo de muerte por causa cardiovascular pudiera estar relacionado con la resistencia a insulina y NODAT comentado previamente, presente en los pacientes trasplantados con VHC+.

A pesar de su impacto adverso en la supervivencia, la infección crónica por VHC no es una contraindicación para el trasplante renal, puesto que como se ha comentado en esta introducción, las tasas de supervivencia de los



pacientes con infección crónica por VHC que se mantienen en lista de espera de trasplante renal, son menores que las observadas tras el trasplante.<sup>99</sup>

Nuestra tesis responde a la necesidad publicada entre otros por Hussain<sup>32</sup> y por Morales et al.<sup>100</sup> de investigar la existencia de asociación significativa entre GT y VHC+ en poblaciones más grandes de las hasta ahora publicadas y con un diagnóstico histopatológico por inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Este es el método es el más idóneo para el diagnóstico de la GT.

## ***IV. HIPÓTESIS***

## IV. HIPÓTESIS

1. Existe asociación entre la presencia de VHC positivo y el desarrollo de glomerulopatía del trasplante en los injertos renales de los pacientes trasplantados estudiados mediante microscopía electrónica.
2. La supervivencia de los injertos renales con glomerulopatía del trasplante es menor en los pacientes con infección crónica por VHC positivos que en los pacientes VHC negativos.

## ***V. OBJETIVOS***

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO PRIMARIO

1. Determinar si existe asociación entre la infección por VHC y el desarrollo de la glomerulopatía del trasplante en los injertos renales. (En muestras diagnosticadas mediante microscopía electrónica).
2. Analizar el impacto de la presencia de VHC positivo en la supervivencia de los pacientes y de los injertos renales diagnosticados de glomerulopatía del trasplante.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar la supervivencia del injerto renal en las dos cohortes desde el diagnóstico de glomerulopatía del trasplante.
2. Describir y analizar las circunstancias demográficas, clinicobiológicas e inmunológicas asociadas al diagnóstico de glomerulopatía del trasplante en las dos cohortes de pacientes; VHC positivos y VHC negativos.
3. Evaluar si existen diferencias entre ambas cohortes en pacientes con glomerulopatía del trasplante en cuanto a la presencia de rechazo agudo previo, función renal, proteinuria y presencia de HLA y/o C4d+.
4. Determinar si existe asociación entre la presencia de C4d+ y el desarrollo de glomerulopatía del trasplante; sólo y asociado a la presencia del VHC.

5. Evaluar si existen diferencias entre las dos cohortes en cuanto al tiempo de aparición de la lesión histológica desde el momento del trasplante renal.
6. Evaluar la importancia del diagnóstico de la GT por microscopía electrónica.

## ***VI. MATERIAL Y MÉTODOS***

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. ESTRUCTURA DE LA TESIS: TIPO DE ESTUDIO.

Este trabajo se encuentra dividido en dos partes:

- La primera parte es un estudio analítico de casos y controles de todos los pacientes diagnosticados con microscopía electrónica de Disfunción crónica del injerto en las biopsias de injerto renal realizadas entre el 01/01/2000 y el 30/12/2014 en el Hospital Doce de Octubre de Madrid; siendo los casos los pacientes que tienen glomerulopatía del trasplante y los controles los que no la tienen. En ambos se estudió la prevalencia del VHC. Se analizaron las características de ambos grupos realizando estudio comparativo entre ellos y análisis de supervivencia del injerto renal.
- La segunda parte es un estudio de cohortes retrospectivo de todos los pacientes diagnosticados por microscopia electrónica de glomerulopatía del trasplante en el mismo periodo y misma área de salud, en el que se realizó un análisis de supervivencia del injerto renal en dos cohortes: pacientes VHC + y VHC -. Se analizaron ambas cohortes por separado realizando estudio comparativo entre ellas.

### B. FUENTE DE DATOS:

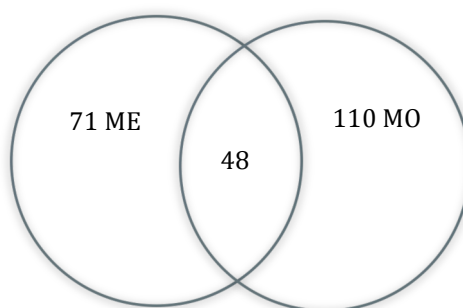
Los datos de la población a estudiar fueron recolectados del registro de biopsias de injertos renales del servicio de Anatomía Patológica, en la unidad de microscopía electrónica, del Hospital Doce de Octubre de Madrid desde enero de 2000 hasta diciembre de 2014 de pacientes que fueron trasplantados desde 1994. Según este registro se identificaron a todos los pacientes de ese periodo, un total de 229 pacientes, con diagnóstico por



microscopía electrónica y/o óptica de disfunción crónica del injerto (rechazo crónico, nefropatía crónica del injerto, fibrosis y atrofia tubular). Posteriormente se revisaron las historias clínicas y los estudios micro y ultraestructurales de las biopsias de los injertos renales realizados a estos pacientes.

### C. POBLACIÓN A ESTUDIAR:

De acuerdo con el registro de biopsias renales del hospital Doce de Octubre de Madrid, un total de 229 pacientes fueron diagnosticados mediante microscopía óptica (110 pacientes), electrónica (71 pacientes) o ambas (48 pacientes) de disfunción crónica del injerto. Estas biopsias se llevaron a cabo según criterios clínicos, realizándose en todos los pacientes que presentaron un gradual y progresivo aumento de la creatinina y/o proteinuria  $>1\text{g}/24\text{h}$  de manera mantenida tras descartarse obstrucción del tracto urinario, causas vasculares, y nefrotóxicas que pudieran justificar el deterioro.



*Figura 3.* Población a estudio: Total 229 ptes. Disfunción Crónica.

*Figura 3: Pacientes con Disfunción Crónica del injerto por Biopsia renal en el periodo de enero de 2000 a diciembre de 2014*

1. **Criterios de inclusión:** todos los pacientes trasplantados renales mayores de 16 años en el periodo de estudio, que presentaron disfunción crónica del injerto diagnosticada mediante microscopía electrónica como condición absoluta.

- a) En la primera parte del estudio de diseño casos y controles se incluyeron a todos los pacientes trasplantados renales diagnosticados de disfunción crónica del injerto (rechazo crónico, nefropatía crónica del injerto, glomerulopatía del trasplante, fibrosis intersticial y atrofia tubular). Un total de 119 pacientes.

El diagnóstico se obtuvo mediante biopsia renal y fue corroborado con estudio de microscopía electrónica e IF en todos los casos.

- b) En la segunda parte del estudio de diseño de Cohortes retrospectivas, del grupo de 119 pacientes con disfunción crónica del injerto, se seleccionaron todos los pacientes que cumplieron criterios anatomopatológicos de glomerulopatía del trasplante. Un total de 57 pacientes.

El diagnóstico se obtuvo mediante biopsia renal y fue corroborado con estudio de microscopía óptica, microscopía electrónica e inmunofluorescencia en todos los casos.

2. **Criterios de exclusión:** se excluyeron a los pacientes menores de 16 años o con datos no disponibles. Se excluyeron todos los pacientes en los que el diagnóstico de disfunción crónica del injerto no se realizó con microscopía electrónica. Un total de 110 pacientes. Se define de forma detallada en los siguientes puntos:

- a) En la primera parte del estudio analítico de casos controles se excluyeron a los pacientes trasplantados renales en los que el estudio anatomopatológico de su biopsia renal no mostró datos de lesión crónica. Se excluyeron también todos los pacientes sin estudio por microscopía electrónica.
- b) En la segunda parte del estudio de diseño de Cohortes retrospectivas se excluyeron a los pacientes trasplantados renales que no cumplieron criterios diagnósticos por ME e IF de glomerulopatía del trasplante. Fueron excluidos pacientes con estudio por MO que demostraron doble contorno, pero que no presentaron reduplicación de la membrana basal glomerular o en los que se evidenció depósito de material electrón-denso en la ME y IF. También se excluyeron a los pacientes con glomerulonefritis de novo o de recidiva, y los pacientes con diagnóstico de fibrosis intersticial- atrofia tubular (FIAT).

**3. Características:**

En estudio se incluyeron biopsias renales analizadas en los últimos 15 años. En este periodo de tiempo han existido cambios de la nomenclatura anatomopatológica que definen la disfunción-lesión crónica del injerto renal. Por esta razón y para que ningún paciente se perdiera, se incluyeron para la recopilación de datos, los diagnósticos de rechazo crónico, nefropatía crónica del injerto, glomerulopatía del trasplante y fibrosis intersticial-atrofia tubular (ver capítulo definiciones).

### **D. MUESTRA:**

En la primera parte del estudio de casos y controles, se estudiaron todos los pacientes trasplantados renales diagnosticados de disfunción crónica del injerto por microscopía electrónica desde enero de 2000 hasta diciembre de 2015. Un total de 119 pacientes.

Se dividieron el total de las muestras en dos grupos, un primer grupo de 57 pacientes con presencia de glomerulopatía del trasplante y un segundo grupo sin glomerulopatía del trasplante de 62 pacientes. En ambos se evaluó la presencia de virus hepatitis C (VHC+). Se analizaron las características de ambos grupos realizando estudio comparativo entre ellos y análisis de supervivencia del injerto renal.

En la segunda parte del estudio de cohortes retrospectivas, se tomó como muestra sólo a los pacientes que cumplieron criterios diagnósticos de glomerulopatía del trasplante desde enero de 2000 hasta diciembre de 2015. Un total de 57 pacientes. Se dividieron el total de los pacientes de la muestra en dos cohortes en función del estado serológico del VHC; un total de 23 biopsias de pacientes VHC+ y 30 VHC-. Del estudio de comparación se perdieron 4 pacientes por no tener datos disponibles.

Se analizan ambas cohortes por separado realizando estudio comparativo entre ellas y análisis de supervivencia del injerto renal.

### **E. VARIABLES RECOGIDAS Y DEFINICIONES:**

Las variables se han seleccionado siguiendo dos parámetros:

- Experiencia acumulada publicada hasta el momento en los artículos originales y revisiones internacionales sobre la disfunción crónica del injerto y la glomerulopatía del trasplante.

- Protocolo clínico del Servicio de Nefrología en relación con el inicio del deterioro de función renal del injerto para plantear la realización de biopsias por indicación.
- Experiencia en el estudio ultraestructural de biopsias renales del servicio de Anatomía Patológica.

Los datos de las variables cuantitativas fueron codificadas con valor entero y dos decimales. Las variables cualitativas se codificaron con números enteros categorizados según la variable a estudio.

Se revisaron todos los estudios de microscopía electrónica, óptica e inmunoelectroforesis de las de biopsias de los injertos renales con disfunción crónica del injerto. De ellos se seleccionaron a los pacientes que cumplieron criterios de glomerulopatía del trasplante (ver criterios diagnósticos establecidos en el trabajo en definiciones) siendo imprescindibles la presencia de doble contorno de la membrana basal glomerular de glomérulos no esclerosados y la ausencia de depósitos electrondensos por inmunofluorescencia (IF) y/o microscopía electrónica (ME). Posteriormente se revisaron todas las historias clínicas de todos los pacientes con disfunción crónica del injerto de forma exhaustiva en la cohorte de glomerulopatía del trasplante.

### **Variables Recogidas:**

Se realizó una tabla Excel rellenando todas las variables disponibles por cada enfermo según la codificación previamente detallada. Las variables recogidas fueron las siguientes.

**1. Variables clínico-demográficas del paciente trasplantado:**

- a) Edad: variable cuantitativa. Número de años completos que tienen el paciente en el momento del trasplante.
- b) Sexo: variable cualitativa dicotómica, varones y hembras.
- c) Etiología de la insuficiencia renal crónica de base: variable cualitativa, no dicotómica. Enfermedad renal que llevó al paciente a tratamiento renal sustitutivo.
- d) Tipo de terapia renal sustitutiva antes del trasplante: variable cualitativa, hemodiálisis, diálisis peritoneal, trasplante.
- e) Tiempo en terapia renal sustitutiva antes del trasplante.
- f) Situación del receptor en el momento del trasplante: situación clínica, inmunológica y viral del receptor en el momento en que recibe el trasplante renal:
  - Diuresis del receptor en el momento del trasplante: variable cuantitativa. Volumen de diuresis.
  - Transfusiones: variable cuantitativa. Número de transfusiones recibidas por el receptor hasta el momento del trasplante.
  - Número de trasplantes: variable cuantitativa. Número que hace este trasplante en el receptor.
  - Serología vírica VHB, HIV y IgG CMV: variable cualitativa dicotómica, si/no. Positividad en alguno de ellos.
  - Serología vírica VHC: variable cualitativa dicotómica. La infección por VHC se definió por la positividad del antígeno VHC (Ag VHC), RNA+ (Enzimo Inmuno Análisis-EIA-2/3) en el momento del trasplante renal. No hubo ningún caso con positivización del Ag VHC en el seguimiento de los pacientes de la muestra.
- g) Estado inmune del receptor:
  - HLA máximos del receptor: variable cuantitativa. Anticuerpos citotóxicos máximos del receptor en su historia inmunológica conocida.

- HLA en el momento del trasplante: variable cuantitativa. Anticuerpos citotóxicos que presenta el paciente en el momento del trasplante renal.
- Estado de hiperinmunizado en el momento de trasplante: variable cualitativa dicotómica, si/no. Se considera hiperinmunizado a la presencia de anticuerpos citotóxicos frente a panel previos al trasplante > 75%.
- Compatibilidades HLA: variable cuantitativa. El número total de compatibilidades HLA se calculó como la suma del número de compatibilidades en los loci A, B y DR.

## 2. Variables clínico-demográficas del donante:

- a) Edad del donante: variable cuantitativa.
- b) Sexo del donante: variable cualitativa dicotómica, varón y hembra.
- c) Características del donante: variable cualitativa (donante vivo, donante en asistolia o donante en muerte encefálica)
- d) FRA en el donante: variable cuantitativa. Función renal medida por creatinina en mg/dl, que presenta el donante en el momento de la donación.
- e) Tiempo de isquemia fría: variable cuantitativa.

## 3. Variables relacionadas con el tratamiento:

- a) Tratamiento inmunosupresor: variable cualitativa no dicotómica. Pauta de tratamiento inmunosupresor utilizado en el momento del trasplante de los pacientes. En el tratamiento de inducción se detalla de forma especial el uso de timoglobulina o de simulect.
- **Grupo de Pauta Clásica:** las pautas clásicas en la inducción que fueron las que unían a la prednisona y al Micofenolato un anticalcineurínico, Ciclosporina o Tacrólimus. Se determinó también el

uso de Azatioprina o Atgam en lugar del Micofenolato: Las dosis utilizadas:

- Dosis de Prednisona: 0,5mg/Kg/día
  - Dosis de Prograf: 0,1-0.2mg/Kg/día
  - Dosis de Ciclosporina: 6-8mg/Kg/día
  - Dosis de Micofenolato: 500mg/12h
- **Grupo de Ensayos Clínicos:** pacientes incluidos en estudios de diferentes ensayos clínicos:
- Ensayo clínico Prednisona+Micofenolato: 2 pacientes
  - Ensayo clínico Prednisona+Ciclosporina+Certicam: 1 paciente
  - Ensayo clínico Prednisona+Rapamicina+Micofenolato: 1 paciente.

En el seguimiento de los pacientes trasplantados, fundamentalmente atendiendo a la pauta clásica, existe en nuestro centro la tendencia a mantener tratamiento con anticalcineurínico e ir retirando progresivamente esteroides, lo cual se realiza de forma individualizada en cada caso.

#### 4. Variables de evolución clínica:

Evolución del trasplante hasta el momento del deterioro:

- a) Retraso de función del injerto: variable cualitativa dicotómica. Si/no.
- Presencia de retraso en la normalización de la creatinina en el postrasplante inmediato. El diagnóstico del retraso de la función del injerto se definió de acuerdo a criterios clínicos, con ausencia de descenso progresivo de la creatinina pasados los primeros 7 días del trasplante, con necesidad de hemodiálisis, después de haber descartado



el rechazo hiperagudo o acelerado, complicaciones vasculares y obstrucción del tracto urinario.

- b) Numero de hemodiálisis: variable cuantitativa. Número de sesiones de hemodiálisis en el postrasplante inmediato que ha precisado el paciente por un retraso en la función del injerto.
- c) Rechazo agudo: variable cualitativa dicotómica; si/no. El diagnóstico de rechazo agudo en cualquier momento de la evolución del injerto renal hasta el momento del diagnóstico de la disfunción crónica del injerto. Se definió de acuerdo a criterios clínicos e histológicos mediante realización de biopsia renal. El tipo histológico de rechazo agudo se clasificó de acuerdo a los criterios de Banff 1997 como intersticial (tipo I) o vascular/humoral (tipos II y III).
- d) Tratamiento del rechazo agudo: variable cualitativa. Pauta de tratamiento inmunosupresor que se realizó del rechazo agudo en función del tipo descrito previamente, intersticial o vascular.
- e) Creatinina pos tratamiento del rechazo agudo: cuantitativa con dos decimales. Mejor dato de creatinina en mg/dl obtenido tras el tratamiento del rechazo agudo.

##### 5. Variables de evolución analítica:

Todas son variables cuantitativas. Se analizaron los siguientes parámetros:

- a) Creatinina (Cr), tasa de filtrado glomerular (TFG) y proteinuria a los 3,6 meses y al 1,2,6 años tras el trasplante. Variables cuantitativas con dos decimales. La Cr medida en mg/dl. La TFG fue estimada utilizando la ecuación del aclaramiento de creatinina con orina recogida de 24 horas:  $TFG(\text{ml}/\text{min}) = \frac{\text{Creatinina en sangre} \times (\text{Volumen}/\text{minuto})}{\text{Creatinina en orina}}$ . La proteinuria se midió en gramos de proteína recogidos en orina de 24 horas.

Los mismos datos se recogieron en el momento de la realización de biopsia renal que llevó al diagnóstico de disfunción crónica del injerto, por deterioro de creatinina (mayor creatinina observada antes de la biopsia) o aumento de proteinuria > 1g/24 horas de manera mantenida, tras descartarse obstrucción del tracto urinario, causas vasculares, y nefrotóxicas que pudieran justificar el deterioro.

**6. Variables diagnósticas:**

**a) Diagnostico por microscopía óptica:**

- Atrofia tubular y fibrosis intersticial: variables cualitativas dicotómicas; si/no.
- Tipo de atrofia tubular y de fibrosis intersticial: variables cualitativas ordinales. Se diferencian tres grados de lesión; leve, moderada, severa.
- Vasculopatía: variable cualitativa dicotómica; si/no.

**b) Diagnóstico por inmunofluorescencia (IF):**

- Depósitos intra MBG: variable cualitativa dicotómicas; si/no. Depósitos en la membrana basal glomerular de inmunocomplejos.

**c) Diagnóstico por inmunohistoquímica:**

- C4d+: variable cualitativa dicotómica; si/no. Presencia de depósitos de C4d en la membrana basal glomerular y/o capilares peritubulares de las muestras de biopsia de injerto renal de los pacientes con glomerulopatía del trasplante.

**d) Diagnóstico por microscopía electrónica:**

Variables cualitativas dicotómicas; si/no en todos los casos:

- Glomerulopatía del trasplante: presencia de glomerulopatía del trasplante en las biopsias realizadas con disfunción crónica del injerto. El diagnóstico de glomerulopatía del trasplante se define de forma detallada más adelante.

- Doble contorno: definido como la presencia en la membrana basal glomerular de doble contorno o reduplicación de la lámina rara.
- Ampliación de la lámina rara interna: ampliación del espacio subendotelial.
- Tumefacción endotelial.
- Capilares peritubulares: reduplicación de la membrana basal de los capilares peritubulares.
- Presencia de trombos glomerulares. Todos los pacientes que presentaron clínica o analítica compatible con microangiopatía trombótica fueron excluidos.
- Vasculopatía

### **7. Variables temporales:**

- a) Años de trasplante en la Biopsia: tiempo en años desde el momento del trasplante hasta el momento de la biopsia diagnóstica de disfunción crónica del injerto.
- b) Años de trasplante desde la Biopsia hasta fin de seguimiento: tiempo en años desde el momento de la biopsia del injerto hasta el evento final, siendo éste vuelta a terapia renal sustitutiva, éxitus o injerto funcionando a final del seguimiento.
- c) Años de trasplante hasta fin de seguimiento: tiempo en años desde el momento del trasplante hasta el evento final, siendo éste vuelta a terapia renal sustitutiva, éxitus o injerto funcionando a final del seguimiento.

### **Definición de Glomerulopatía del Trasplante (GT):**

Histológicamente se considera que la GT representa un patrón diferenciando de lesión crónica del injerto renal que comprende los capilares del injerto renal y se manifiesta por los efectos de uno o más etiologías incluyendo C4d asociado a rechazo mediado por anticuerpos, microangiopatía trombótica y la infección por VHC.

Las características ultraestructurales que se encuentran en la GT son:

1. Reduplicación o multilaminación de la GMB con o sin interposición mesangial. La reduplicación e interposición mesangial pueden ser circunferenciales en casos severos.
2. Ausencia de depósitos inmunes (electrón-densos) en glomérulos no esclerosados.
3. Zonas subendoteliales ampliadas electron-lucentes.
4. Reduplicación de la lamina basal de los capilares peritubulares (capilaropatía del trasplante). Este hallazgo en el contexto clínico apropiado de proteinuria y aumento de creatinina está considerado como un marcador altamente predictivo de GT.
5. Fusión de los podocitos. El grado del mismo está generalmente en sincronía con el grado de proteinuria. Puede ser severo en casos de GT avanzada.
6. Hipertrofia endotelial y disminución de la fenestración endotelial en el glomérulo y de los capilares peritubulares. El grado de la afectación endotelial está generalmente en sincronía con la severidad de la glomerulopatía del trasplante.
7. Expansión de la matriz mesangial.
8. Glomerulitis

Conocidas las características de la lesión, los criterios diagnósticos que se siguieron en nuestro estudio para el diagnóstico de glomerulopatía del trasplante fueron la presencia en el estudio ultraestructural y de inmunofluorescencia de reduplicación o multilaminación de la membrana basal glomerular en ausencia de depósitos inmunes (ausencia de depósitos electrón-densos). Ambos criterios con la presencia de alguna de las siguientes características:

- Reduplicación de los capilares peritubulares: su presencia en la biopsia se consideró como dato de fortaleza en el diagnóstico.
- Ampliación del espacio subendotelial.
- Presencia de células endoteliales hinchadas.
- Pérdida de las fenestraciones de las células endoteliales
- Expansión de la matriz mesangial.

### **Definición de Disfunción Crónica del Injerto en el estudio:**

Con el objeto de estandarizar la interpretación de la biopsia del trasplante renal y para poder establecer una guía terapéutica, se desarrolló la Clasificación de Banff cuyo origen fue en el año 1991 en Banff (Canadá), redefiniéndose posteriormente en siguientes reuniones en años posteriores. Este hecho origina que la nomenclatura histológica que define la disfunción crónica del injerto ha ido variando con el tiempo.

Hasta la primera reunión de Banff 1991 se usó el término **Rechazo Crónico** para describir la existencia de lesiones crónicas en las biopsias de injertos renales. Se consideró en esta reunión que el término rechazo crónico hacía referencia a la lesión histológica generada por respuesta aloinmune, y por tanto se cambió por el término **Nefropatía crónica del Injerto (NCI)** que se definió como una entidad histológica caracterizada por la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular con o sin engrosamiento de la íntima arterial.

Posteriormente se consideró muy inespecífico el término NCI y en la reunión de Banff 2005 se cambió comenzándose a utilizar el término **Rechazo Crónico Humoral** (biopsias con lesiones histológicas sugestivas como la presencia de glomerulopatía del trasplante y engrosamiento de la íntima arterial con presencia de C4d en los capilares peritubulares y presencia de DSA). Se creó una nueva categoría diagnóstica: **Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular** para hacer referencia a aquellas biopsias que presentaban lesión crónica sin C4d ni DSA.

Por esta razón y para que ningún caso se perdiera en nuestro estudio, se incluyeron en la búsqueda para el reclutamiento de todos los casos con disfunción crónica del injerto, los diagnósticos de rechazo crónico, nefropatía crónica del injerto, glomerulopatía del trasplante y fibrosis intersticial-atrofia tubular.

### 6. TÉCNICAS DE MEDIDA DE LAS VARIABLES:

- Serología viral: para el estudio del Ag VHC se utilizó el (Enzimo Inmuno Análisis-EIA- 2/3).
- Filtrado glomerular: (TGF): el aclaramiento de creatinina según la ecuación  $TGF = \text{Creatinina en sangre} \times (\text{Volumen/minuto}) / \text{Creatinina en orina}$ . En muestra recogida de orina de 24 horas.
- Proteinuria: gramos de proteína en orina recogida de 24 horas.
- Microscopio electrónico: se usó un microscopio de transmisión JEOL modelo 100SX de 2500-1500 aumentos a 80 Kvoltios. Las imágenes se tomaron con una cámara Olympus Megaview.
- Estudio inmunológico de los anticuerpos por linfocitotoxicidad. Específicamente los anticuerpos antidonante específicos fueron analizados por citometría de flujo (tecnología luminex).

## 7. MANEJO DE LOS DATOS:

El diagnóstico anatomopatológico se llevó a cabo por el servicio de Anatomía Patológica del hospital Doce de Octubre de Madrid. Se obtuvieron los datos del registro de biopsias renales de microscopía óptica y microscopía electrónica del referido servicio.

Los datos clínicos y analíticos de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas de la consulta de Trasplante renal del Hospital Doce de Octubre de Madrid.

Los datos fueron analizados por la investigadora principal de este estudio.

## 8. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS:

### 1. Análisis descriptivo:

Las variables cualitativas (categóricas) (nominales y ordinales) son presentadas como proporciones, describiéndose con el número absoluto y la frecuencia de pacientes en cada categoría.

Las variables cuantitativas (discretas y continuas) son presentadas con estadísticos de centralización (media y mediana) y de dispersión (desviación típica, mínimo y máximo). Se describen como media  $\pm$  desviación típica.

### 2. Análisis analítico:

La comparación entre los grupos fue hecha usando el test de Chi-cuadrado de Pearson para las variables cualitativas con distribución normal. Para las variables cuantitativas con distribución normal se utilizó el test de T-Student.

El análisis univariante se realizó para analizar la asociación entre la presencia de VHC + y la glomerulopatía del trasplante en todos los pacientes

con disfunción crónica del injerto. Para la comparación de las variables categóricas se utilizó la prueba estadística de Chi-cuadrado de Pearson como test paramétrico, y la prueba exacta de Fisher como test no paramétrico para las variables cualitativas.

Para la comparación de variables continuas se realizó la T de Student como test paramétrico y la prueba de U-MnWitney como test no paramétrico.

Las curvas de supervivencia del paciente y del injerto censuradas por vuelta a terapia renal sustitutiva, éxitus o injerto activo a final de seguimiento, fueron calculadas por en análisis de Kaplan-Meier y comparadas por el test de Log-Rank.

El análisis multivariante se realizó para analizar la influencia de la presencia de C4d, anti-HLA, VHC y DSA en el tiempo de supervivencia del injerto usando el test de regresión de Cox. Asimismo también para evaluarlas como posibles factores de riesgo para glomerulopatía del trasplante mediante regresión logística.

Para evaluar la normalidad de las muestras se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

El nivel de significación estadística elegido fue de  $p < 0,05$ .

El tratamiento estadístico fue realizado con la aplicación informática del programa estadístico SPSS versión 17.



## 9. TRATAMIENTO DE LA BIBLIOGRAFÍA.

Las fuentes bibliográficas utilizadas para el estudio fueron Medline en su versión en Internet (PubMed), Up to Date, libros especializados de consulta de nefrología y de anatomía patológica.

Los trabajos científicos consultados se expresaron aceptando las normas de Vancouver.

## ***VII. RESULTADOS***

## VII. RESULTADOS

### A. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DEL DIAGNÓSTICO:

Del total de pacientes trasplantados renales en el Hospital Doce de Octubre de Madrid en el periodo de enero de 2000 hasta diciembre de 2014 se obtuvieron 239 muestras de biopsias renales que correspondieron a 229 pacientes compatibles con disfunción crónica del injerto. (A 10 pacientes se les realizaron 2 biopsias separadas temporalmente en las que se obtuvo entre alguno de sus diagnósticos el de disfunción crónica del injerto.) Los resultados del estudio se realizaron en función del número de pacientes, no de muestras de biopsia. De ellos 4 pacientes no fueron analizados por datos no disponibles.

#### 1. PROPORCIÓN DE PACIENTES GT EN FUNCIÓN DEL TIPO DE ESTUDIO:

De los 225 pacientes, 106 se estudiaron sólo con Microscopía óptica (MO), 71 se estudiaron sólo con Microscopía electrónica (ME) y 48 pacientes se estudiaron con ambas técnicas (ME+MO).

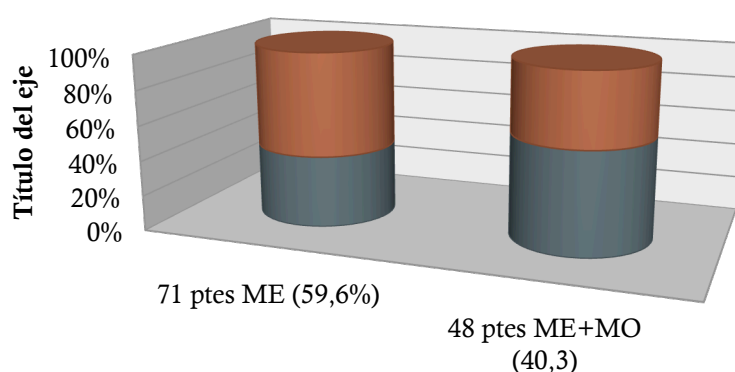
Como pasamos a detallar, un total de 119 pacientes recibió al menos un estudio por microscopía electrónica y un total de 154 recibió al menos un estudio por microscopía óptica:

##### a) **Proporción de GT en los todos pacientes con un estudio por ME:**

En el grupo de 119 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por microscopía electrónica, sólo 48 (40,3%) presentaron el mismo diagnóstico en el estudio de microscopía óptica. En los 71 pacientes restantes(59,6%) diagnosticados por ME no se registró diagnóstico de disfunción crónica del injerto en el estudio de MO en la misma pieza de biopsia renal. (*Ver gráfico 1.*

- a. De los 48 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por ME+MO, 28 cumplieron criterios diagnósticos de GT y 20 no, lo que corresponde a un 58,3% vs. 41,6% respectivamente.
- b. De los 71 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto solamente por ME, 29 (40,8%) cumplieron los criterios de glomerulopatía del trasplante y 42 (59,1%) no.
- c. Un total de 57 pacientes cumplieron criterios diagnósticos de GT en la muestra de ME.

**Gráfico 1: Pacientes diagnosticados de disfunción crónica con ME: 119 ptes.**



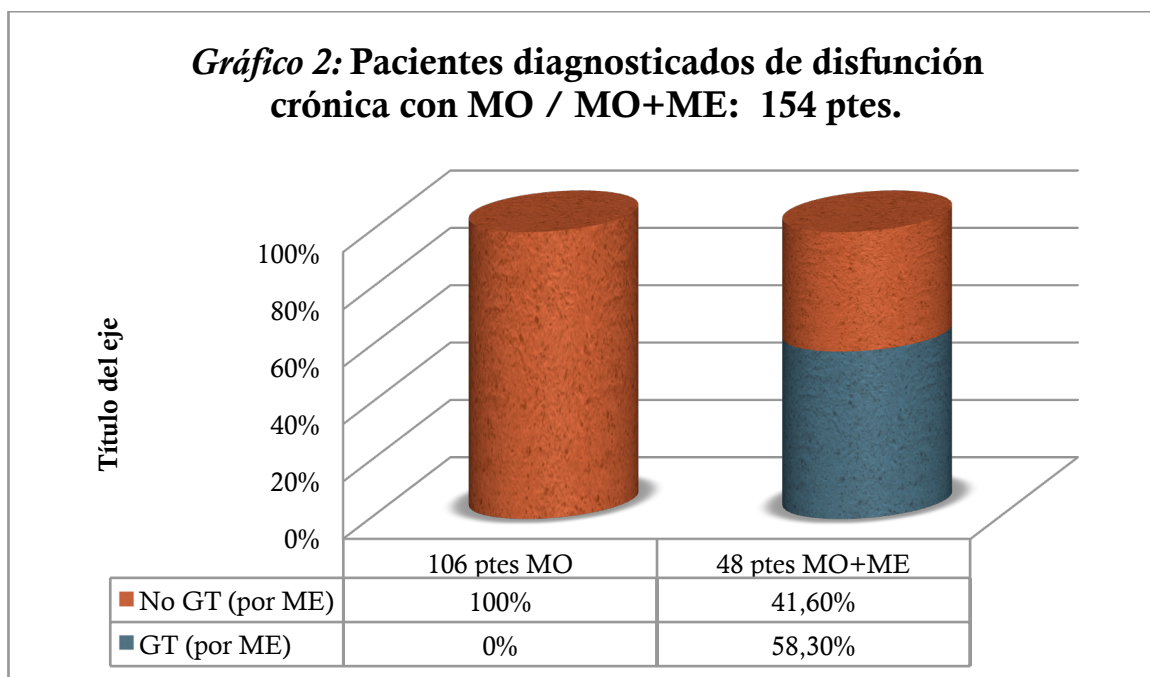
	71 ptes ME (59,6%)	48 ptes ME+MO (40,3)
■ No GT	59,10%	41,60%
■ GT	40,80%	58,30%

En el estudio de la proporción de GT en muestras de ME con diagnóstico de disfunción crónica del injerto, de 119 pacientes se diagnosticaron 57, lo que corresponde a un 47,8% del total de 119 pacientes.

- b) Proporción de pacientes con GT perdidos si el estudio fuese realizado sin ME: (gráfico 2)

En el grupo de 154 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por microscopía óptica, sólo a 48 (31,2%) de los 154 pacientes se les completó el estudio con microscopía electrónica. En el resto de pacientes, un total de 106 (71,4%), no presentó estudio ultraestructural o, habiéndose realizado, no se corroboró. Ver figura.

- De los 48 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por ME+MO, 28 cumplieron criterios diagnósticos de GT y 20 no, lo que corresponde a un 58,3% vs. 41,6% respectivamente.
- De los 106 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por MO ninguno pudo ser diagnosticado de glomerulopatía del trasplante según los criterios diagnósticos del estudio basados en los datos bibliográficos publicados.
- Un total de 28 pacientes cumplieron criterios diagnósticos de GT en la muestra de MO corroborados por ME.



En el estudio de la proporción de GT+ en muestras diagnosticadas de disfunción crónica del injerto con al menos un

estudio de MO (154 pacientes) se encontraron 28 pacientes con GT (con diagnóstico confirmado por ME según nuestro protocolo diagnóstico).

c) Proporción de GT en todos los pacientes estudiados con ME y MO.

En el grupo de 225 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por MO, ME o ambas (106, 71 y 48 pacientes respectivamente), se obtuvo el diagnóstico de glomerulopatía de trasplante en 57, lo que corresponde a un 25,3% del total de 225 pacientes más pérdidas diagnósticas posibles de los 106 pacientes no evaluados con ME.

2. PROPORCIÓN DE PACIENTES CON GT PERDIDOS SI EL ESTUDIO FUESE REALIZADO SIN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:

Realizamos un nuevo análisis para conocer la proporción de pacientes con diagnóstico de GT si sólo hubiésemos realizado el estudio con las muestras evaluadas por MO sin tomar en cuenta la ME. Un total de 154 pacientes.

De la muestra de 154 pacientes evaluados por MO como disfunción crónica del injerto, sólo se diagnosticaron como GT positivos por MO a 27 pacientes. Los 127 pacientes restantes fueron diagnosticados en el estudio MO como GT negativos.

Posteriormente de los 154 pacientes se cruzaron las muestras de los estudios MO y ME: De los 27 pacientes que se diagnosticaron de GT sólo por MO encontramos lo siguiente

- Sólo en 19 de estos 27 pacientes se confirmó el diagnóstico de GT por por ME.

- En 8 pacientes con un diagnóstico histológico óptico de GT+, no se confirmó en el estudio por ME. Por tanto 8 falsos positivos.
- En 6 pacientes del grupo de estudio de MO que fueron negativos para GT, sí se confirmaron como GT+ al realizar la ME. Por tanto 6 falsos negativos.

El número final (corroborado con ME) de los 154 pacientes de la muestra sólo analizada por MO que realmente fueron GT+ fue de 25 (19 diagnosticados confirmados+6 falsos negativos). Utilizando sólo MO, en nuestra muestra, como hemos dicho se habrían diagnosticado 27 pacientes de los que, como hemos visto, 8 habrían sido falsos positivos.

Al incluir en nuestro estudio a todos los pacientes con diagnóstico de DCI por ME (en los que en MO no se registraron como tales), obtuvimos 71 pacientes más, de los cuales, en 29 se diagnosticó la GT que sumados a los 6 falsos negativos del grupo de MO, dan un total de 35 pacientes que no se hubieran analizado de GT si no hubiésemos utilizado la muestra de microscopía electrónica. De haberse dado este caso, habríamos perdido de la muestra de 225 pacientes un 15,5% de pacientes con GT+.

**B. PRIMERA PARTE DEL ESTUDIO: CASOS Y CONTROLES:****1. ESTUDIO DESCRIPTIVO:**

Se realizó estudio con microscopía electrónica en 119 pacientes (71 con microscopía electrónica (ME) y 48 con microscopía electrónica y microscopía óptica (MO)) que son los que conforman la muestra de esta primera parte de resultados del estudio.

A fecha de fin de seguimiento el 30 de diciembre de 2014, un 51,3% (61 pacientes) de los pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto en el periodo de estudio habían entrado en hemodiálisis, un 9,2% (11 pacientes) fueron éxitus con injerto funcionante y un 27,7% (33 pacientes) seguían vivos con injerto funcionante.

**a) Estudio epidemiológico:****a. Edad.**

Del total de pacientes evaluables, la edad media del receptor en el momento del trasplante renal fue de 46,73  $\pm$  15,6 años (rango 16 a 78 años), siendo ésta significativamente mayor en los pacientes VHC- que en los pacientes VHC+ (48,78 años vs 40,96 años respectivamente;  $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la edad de los pacientes con presencia de GT con respecto al resto sin GT (43,94 años vs 49,68 años respectivamente;  $p = 0,62$ ).

**b. Sexo:**

De los 119 pacientes con diagnóstico de disfunción crónica del injerto, 66 pacientes fueron hombres y 53 mujeres, lo que supone respectivamente el 55,5% y el 44,5%. No hubo diferencias significativas en cuanto a la proporción



de hombres y mujeres entre el grupo con GT y el grupo sin GT ( $p=0,35$ ). (Tabla 1).

<b>Tabla 1: Variables epidemiológicas: Disfunción Crónica del Injerto</b>	
<b>Edad</b>	46,3±15,6 años
<b>Sexo</b>	53 mujeres; 66 hombres
<b>VHC (RNA+)</b>	28 VHC+; 77 VHC-
<b>GT</b>	62 (52,1%) GT-; 57 (47,8%) GT+.

#### c. Histología: diagnóstico de Glomerulopatía de Trasplante con ME:

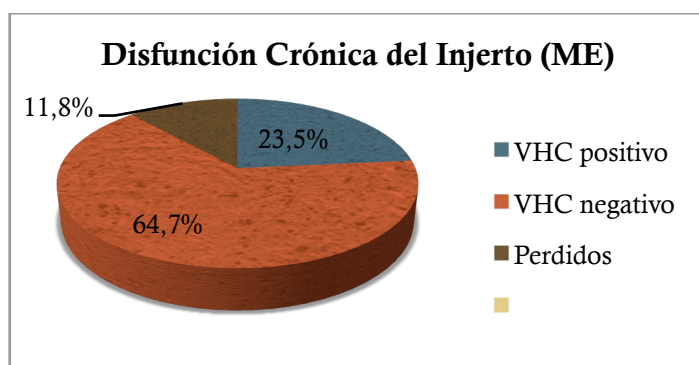
De los 119 pacientes con diagnóstico ultraestructural de disfunción crónica del injerto 57 pacientes cumplieron criterios de glomerulopatía del trasplante (GT) y 62 pacientes no los cumplieron, lo que supone respectivamente el 47,8% y el 52,1% (gráfico 3).



Gráfico 3. Distribución por diagnóstico histológico

#### d. Serología:

La prevalencia de VHC+ en la muestra fue de un 23,5% (gráfico 4)



*Gráfico 4.* Distribución por serología VHC

De los 119 pacientes de la muestra se obtuvieron dos grupos en función de la presencia o no de VHC. De ellos 77 pacientes fueron VHC- (64,7% del total) y 28 (23,5%) fueron VHC+. (*Gráfico 4*). En 14 pacientes los datos serológicos no estuvieron disponibles.

Se realizó comparación de la muestra de pacientes VHC+ y VHC- en función de la presencia o no de GT, observándose que de los pacientes con VHC+ de la muestra, 23 (82,1%) presentaban también GT y sólo en 5 casos (17,9%), el VHC+ no se asoció con la GT. Se exponen los datos en la siguiente tabla:

**Tabla de contingencia Virus C \* Glomerulopatía del transplante (Si/no)**

			Glomerulopatía del transplante (Si/no)		Total
			NO	SI	
Virus C	negativo	Recuento	47	30	77
		% de Virus C	61,0%	39,0%	100,0%
	positivo	Recuento	5	23	28
		% de Virus C	17,9%	82,1%	100,0%
Total		Recuento	52	53	105
		% de Virus C	49,5%	50,5%	100,0%

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proporción de pacientes VHC+ y VHC- en función de la presencia o no de GT (*Tabla 2*);  $p < 0,005$

**Tabla 2: Asociación VHC y GT en la Disfunción Crónica del injerto****GT+ en VHC+**

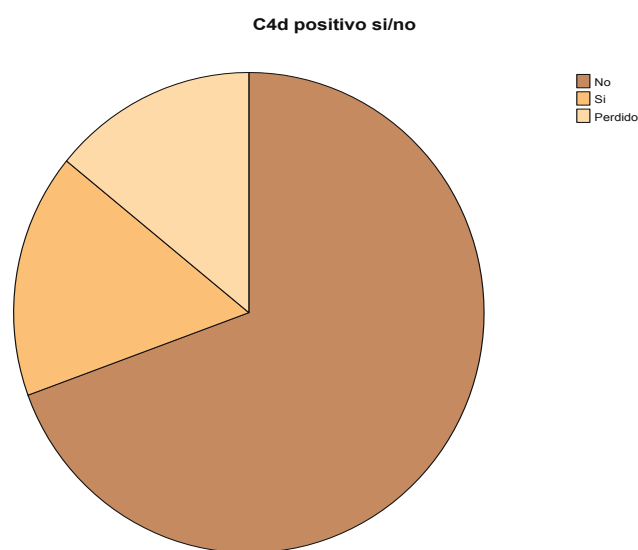
23/28 ptes. (82,1% de VHC+)

**GT+ en VHC-**

30/77 ptes (39% de VHC-)

**p<0,005****e. Estudio de variables clínicas e inmunológicas:**

- i. C4d: De los 119 pacientes de la muestra, se descartaron para el estudio del C4d a los pacientes cuyas biopsias se hubieran realizado antes del 2005 (un total de 34 biopsias), año en el que se introdujo la técnica del C4d en el hospital de recogida de datos.

Gráfico 5

Del total de los 85 pacientes biopsiados a partir del 2005, sólo presentaron positividad para C4d 14 pacientes, siendo negativo en 59, lo que corresponde al 16,5% vs 69,4% de los pacientes. (*Gráfico 5*). Existió una pérdida de 12 casos en los que no se realizó C4d por distintas causas.

**Tabla 3: C4d+ si/no \* Glomerulopatía del trasplante (Si/no):**

	Biopsia sin GT	Biopsia con GT	TOTAL
C4d -	27 (45,8%)	32 (54,2%)	59 (100%)
C4d+	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14 (100%)
Total	32 (43,8%)	41 (56,2%)	73 (100%)

(Existió una pérdida del dato en 12 pacientes, quedando 73 para el análisis).

**No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proporción de pacientes con C4d+ entre el grupo con GT+ y GT- ;  $p=0,49$ . (Tabla 3)**

- ii. DSA: Se obtuvieron los datos de 15 pacientes, de los que 12 fueron DSA +. No hubo diferencias significativas entre los grupos GT+/GT- con respecto al DSA con una  $p=0,5$ .
- iii. Rechazo agudo celular: en el total de los 119 pacientes de la muestra el porcentaje de rechazo agudo celular fue de 37,5% de los pacientes (un total de 45 pacientes)(Tabla 4). No existieron diferencias significativas referentes al antecedente de rechazo agudo celular entre los grupos con/sin glomerulopatía del trasplante ( $p=0,55$ ). (Tabla 5)
- iv. Rechazo agudo vascular/humoral: el 17,5% de los pacientes (un total de 21 pacientes) de la muestra presentaron rechazo agudo vascular/humoral. (Tabla 4). No existieron diferencias significativas del antecedente de rechazo agudo vascular/humoral entre los grupos con/sin glomerulopatía del trasplante ( $p=0,22$ ). (Tabla 5).

- v. Rechazo agudo de cualquier tipo: Al evaluar la existencia de diferencias sumando todos los episodios de rechazo agudo vascular/humoral y celular de cada paciente, tampoco evidenciamos diferencias significativas entre los dos grupos, con 57 episodios de rechazo en el grupo GT+ y 48 episodios de rechazo en el grupo GT- ( $p=0,69$ ).

<b>Tabla 4: Variables Inmunológicas: Disfunción Crónica del Injerto</b>			
	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>PERDIDOS</b>
<b>RECHAZO AGUDO CELULAR</b>	45(37,81%)	59(49,57%)	15
<b>RECHAZO AGUDO VASCULAR</b>	21(17,64%)	83(69,74%)	15
<b>C4d (85Bx desde 2005)</b>	14(16,47%)	59(69,41%)	12

<b>Tabla 5: Asociación de variables inmunológicas con la GT en pacientes con Disfunción Crónica del Injerto</b>				
	<b>GT+ N=57</b>	<b>GT- N=62</b>	<b>P</b>	<b>Sig.</b>
<b>RA Celular</b>	21 (36,84%)	24 (38,70%)	0,55	NS
<b>RA Vascular</b>	13 (22,80%)	8 (12,90%)	0,22	NS

Teniendo en cuenta el estado serológico VHC de los pacientes no evidenciamos una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de

rechazo agudo vascular/humoral en los pacientes VHC+ al compararlo frente a los VHC- (30% vs 70%;  $p=0,66$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la prevalencia del rechazo agudo celular (29,5% vs 70,5%;  $p=0,50$ ) entre VHC+ y VHC- respectivamente.

## 2. ESTIMACIÓN DEL RIESGO DE ASOCIACIÓN DEL VHC CON LA GT:

### a) Presencia de VHC y su asociación con GT:

Se dividieron los pacientes con Disfunción Crónica del Injerto en dos cohortes en función de la presencia de GT. Ambas fueron similares con respecto a características edad, sexo, tipo de trasplante (donante cadáver en la mayoría), C4d, antiHLA, e historia previa de rechazo agudo. En estos dos grupos de pacientes (Gt+/-) se evaluó la relación de la presencia de VHC+ con el desarrollo de la glomerulopatía del trasplante. Como hemos comentado, no se analizaron 14 pacientes de los 119 DCI por datos serológicos no disponibles.

<i>Tabla 6</i>	GT -	GT+	Total
VHC-	47	30	77
VHC+	5	23	28
Recuento VHC	52	53	105

**$P<0,005$**

En el análisis de comparación de proporciones la presencia de VHC+ se asoció de forma significativa con la aparición de glomerulopatía del trasplante;  $p<0,005$ . (*Tabla 6*).

En cuanto a la estimación del riesgo en el análisis univariante, la presencia de VHC+ también se asoció con la GT+, con una OR 7,207 (2,472-21,012).

Con este resultado demostramos que el VHC+ es un factor de riesgo para desarrollar la GT en una muestra de pacientes con datos de ME, con un riesgo 7,20 veces superior que un paciente VHC-.

b) Presencia de C4d (desde 2005) y su asociación con GT:

<i>Tabla 7</i>	GT -	GT+	Total
C4d-	27	32	59
C4d+	5	9	14
Recuento C4d	32	41	73
<b>p=0,57</b>			

*(Existió una pérdida del dato en 12 pacientes de los 83 biopsiados desde 2005, fecha de inicio del análisis C4d en nuestro centro, quedando un total de 73).*

En el análisis de comparación de proporciones la presencia de C4d+ no se asoció de forma significativa con la aparición de glomerulopatía del trasplante (p=0,57). (*Tabla 7*).

En el análisis univariante, el C4d+ no fue un factor de riesgo para GT+ con una OR=1,519 (0,454-5,079). No obstante sí que se evidencia una tendencia a que esa asociación pueda existir, ya que los pacientes con C4d+ tienen 1,51 veces más riesgo de presentar GT+ que los C4d-, aunque esa

asociación no sea significativa. Esta no significancia podríamos atribuirla a poca potencia por un error tipo 2 ya que el tamaño muestral es pequeño.

c) Presencia de DSA y su asociación con GT:

<i>Tabla 8</i>	GT -	GT+	Total
DSA-	0	3	3
DSA+	5	7	12
Recuento DSA	5	10	15

**p=0,50**

En el análisis de comparación de proporciones la presencia de DSA+ no se asoció de forma significativa con la aparición de glomerulopatía del trasplante; p=0,50. (*Tabla 8*).

En cuanto a la estimación del riesgo en el análisis univariante, la presencia de DSA+ si fue un factor de riesgo para GT+ con una **OR=1,714 (1,063-2,765)**.

d) Presencia de RA y su asociación con GT:

En el análisis de comparación de proporciones la presencia de RA (por cualquier causa) no se asoció de forma significativa con la aparición de glomerulopatía del trasplante (p=0,62).

En cuanto a la estimación del riesgo en el análisis univariante, la presencia de RA+ tampoco fue un factor de riesgo para GT+ con una **OR=0,824 (0,38-1,78)**.



**e) Presencia de anti-HLA y su asociación con GT:**

En el análisis de comparación de proporciones la presencia de anti- HLA clase I+II, no se asoció de forma significativa con la aparición de glomerulopatía del trasplante ( $p=0,88$ ).

En cuanto a la estimación del riesgo en el análisis univariante, la presencia de RA tampoco fue un factor de riesgo para GT+ con una OR=0,909 (0,257-3,218).

**3. ANALISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES ALOINMUNES Y GT:**

En el análisis multivariante realizado para C4d, DSA, anti-HLA e historia previa de rechazo agudo, ninguna de ellas se asoció a glomerulopatía del trasplante de forma significativa.

**4. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON VHC+ FRENTE A LOS PACIENTES VHC- EN LA MUESTRA DE DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO:**

A lo largo del periodo de estudio desde 2000 a 2014, la supervivencia de los 119 pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto por microscopía electrónica fue de una media de  $95,7 \pm 7,9$  meses con un IC 95%(80-110) y mediana  $79 \pm 6,4$  con un IC 95%(66,3-91,6).

En cuanto a la supervivencia del injerto en el periodo fue de  $99,1 \pm 8,2$  meses con un IC 95%(83-115) y mediana  $84 \pm 8,7$  con un IC 95%(66,9-101).

Todos los pacientes de la muestra, separados en dos grupos en función de la presencia o no de VHC+, fueron seguidos hasta la progresión al fallo renal y vuelta a diálisis vs. injerto funcionando o muerte por otra causa con injerto funcionando hasta el fin del seguimiento:

a) Supervivencia del injerto renal hasta la biopsia comparando grupo VHC+ y VHC-:

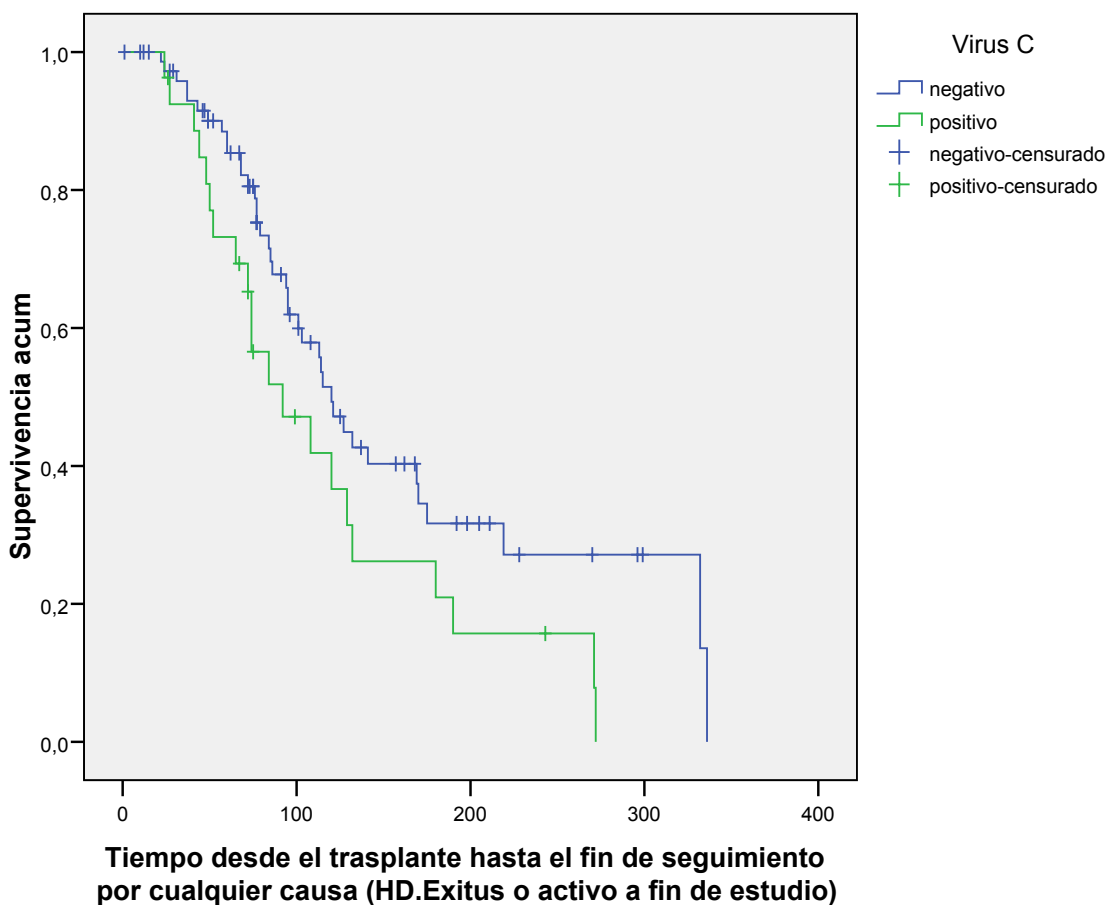
En el análisis se supervivencia por Kaplan-Meier hasta el momento de la biopsia renal diagnóstica de disfunción crónica del injerto, no hubo diferencias entre los grupos VHC+ y VHC- estando en 84,18 meses y 77,7 meses de media respectivamente  $p=0,72$  log-rank test.

b) Supervivencia del injerto renal hasta el fin de seguimiento comparando VHC+yVHC-:

Analizada la supervivencia del injerto hasta el fin del seguimiento por cualquier causa, encontramos que la supervivencia de los pacientes VHC- es significativamente mayor que la de los pacientes VHC+;  $p<0,05$ , log-rank test.

- La media en los pacientes VHC- fue de  $166,5 \pm 16,2$  meses con un IC 95%(134,7-198,3) y mediana  $120 \pm 8,8$  con un IC 95%(102,6-137,4).
- La media en los pacientes VHC+ fue de  $118 \pm 17,1$  con un IC 95%(85,2-152,35) y mediana  $92 \pm 23,8$  con un IC 95%(45,2-138,7)

## Funciones de supervivencia

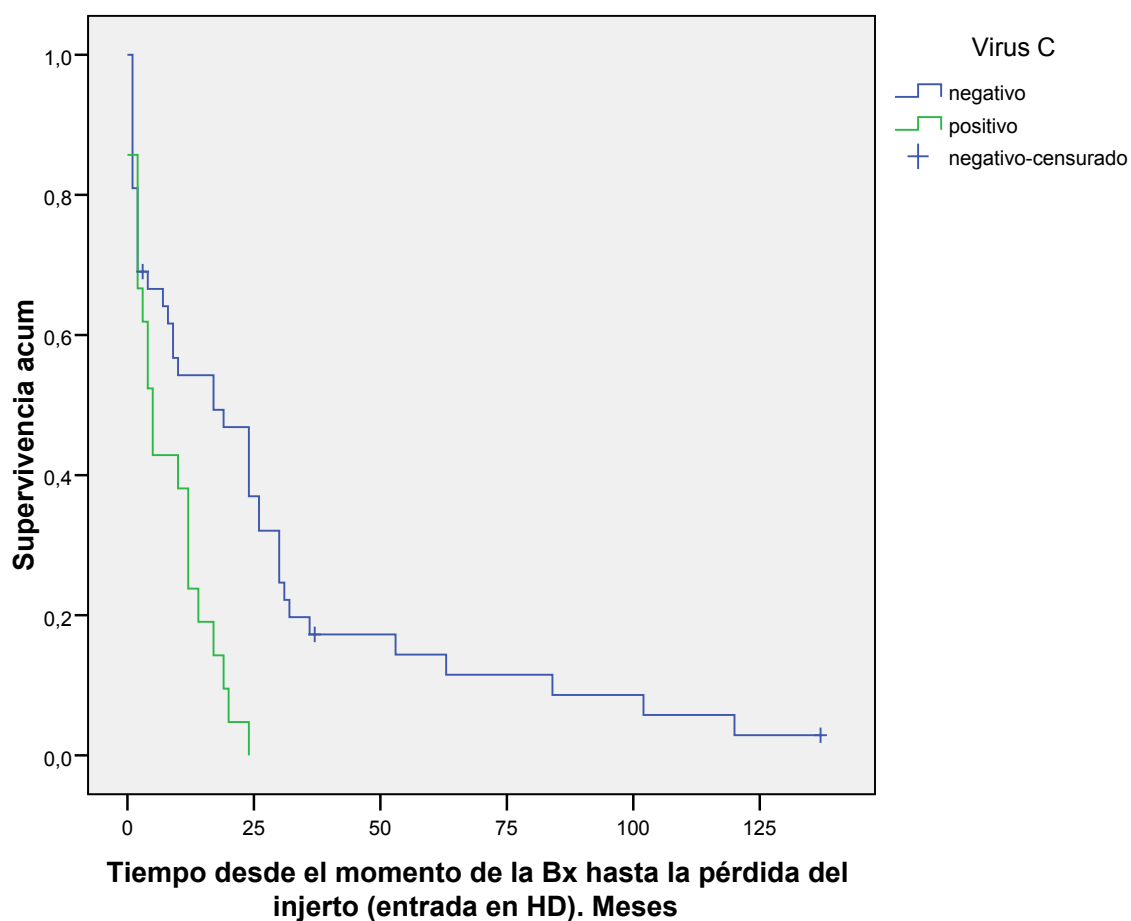


c) Supervivencia del injerto desde el diagnóstico de la biopsia renal hasta el fin de seguimiento comparando VHC+/VHC-: Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia del injerto entre los dos grupos de pacientes VHC+ y VHC- desde el momento de la biopsia diagnóstica de disfunción crónica del injerto. **p<0,005**, log-rank test.

- La media en los pacientes VHC- fue de  $27,28 \pm 5,4$  meses con un IC 95%(16,6-37,9) y mediana  $17 \pm 5,9$  con un IC 95%(5,3-28,6).

- La media en los pacientes VHC+ fue de  $8,04 \pm 1,6$  meses con un IC 95%(4,8-11,2) y mediana  $9,02 \pm 2,2$  con un IC 95%(5,6-14,3).

### Funciones de supervivencia



$p < 0,005$

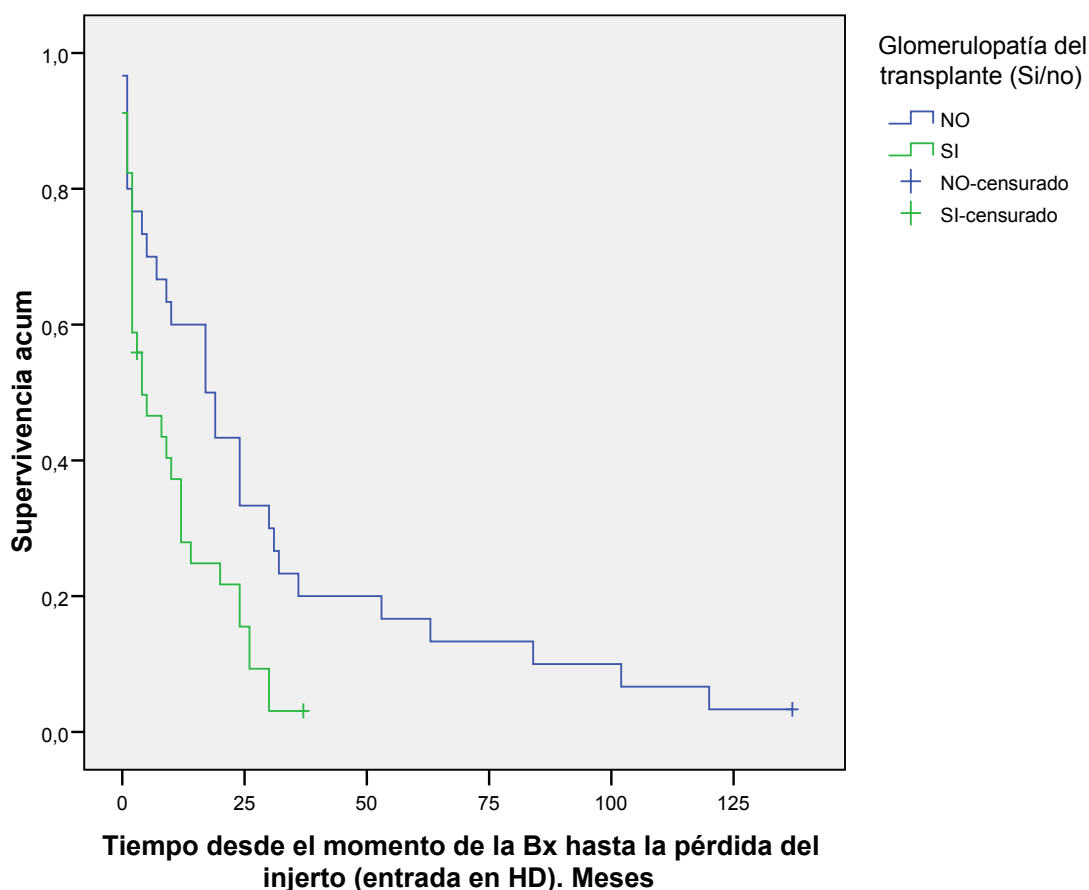
Al evaluar mediante regresión de Cox qué otras variables pudieron influir en el tiempo de supervivencia obtuvimos que ninguna, ni C4d ni DSA ni anti-HLA influyeron de forma significativa en el tiempo de supervivencia del injerto desde el trasplante hasta el fin del seguimiento.

## **5. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON GT FRENTE A LOS PACIENTES SIN GT EN LA MUESTRA DE DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO:**

Todos los pacientes de la muestra, separados en dos grupos en función de la presencia o no de GT+, fueron seguidos hasta la progresión al fallo renal y vuelta a diálisis vs. injerto funcionante + muerte por otra causa con injerto funcionante hasta el fin del seguimiento:

- a) **Supervivencia del injerto renal hasta la biopsia comparando grupo GT+ y GT-:** En el análisis se supervivencia por Kaplan-Meier hasta el momento del diagnóstico de GT no hubo diferencias entre los grupos GT+ y GT- estando en 87,3 meses y los 70,9 meses de media respectivamente  $p=0,18$  log-rank test.
- b) **Supervivencia del injerto renal hasta el fin de seguimiento comparando GT+yGT-:** No se evidenció una diferencia significativa de la supervivencia del injerto renal en los pacientes diagnosticados de GT frente a los no GT cuando lo evaluamos desde el momento del trasplante;  $p=0,65$  log-rank.
- c) **Supervivencia del injerto desde el diagnóstico de la biopsia renal hasta el fin de seguimiento comparando GT+ y GT-:** Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia del injerto entre los dos grupos de pacientes GT+ y GT- desde el momento de la biopsia diagnóstica de disfunción crónica del injerto.  $p<0,05$ , log-rank test.

## Funciones de supervivencia



$p < 0,05$

- La media de supervivencia de los pacientes con GT fue de  $9,76 \pm 1,84$  (IC 95% 6,15-13,3) , con una mediana de  $4 \pm 1,7$  (IC 95% 0,57-7,42) meses.
- La media de supervivencia de los pacientes sin GT fue de  $27,70 \pm 6,67$  (IC 95% 16,62-42,77), con una mediana de  $17 \pm 4,9$  (IC 95% 7,33-26,68) meses.

En el estudio de regresión de Cox, analizando VHC+ y C4d mostró que la presencia de VHC+ fue el único factor que se asoció a mayor rapidez en la progresión del fallo renal con un HR = 3,81 (1,48-9,9) y  $p < 0,05$ . El C4d no fue significativo con un HR 1,04 (0,38-2,82) y  $p = \text{NS}$ .

### C. SEGUNDA PARTE DEL ESTUDIO. COHORTES RETROSPECTIVAS:

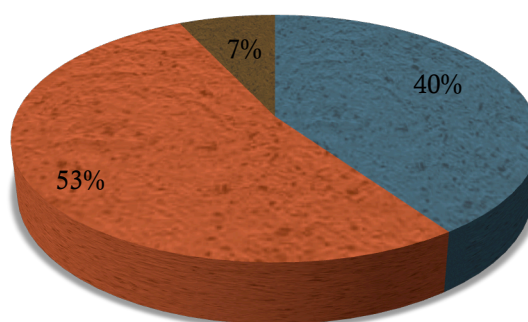
De los 119 pacientes diagnosticados con microscopía electrónica (71 con microscopía electrónica y 48 con microscopía electrónica y óptica) de disfunción crónica del injerto, en 57 se obtuvo el diagnóstico de glomerulopatía del trasplante lo que supone una prevalencia de 47,89% de los pacientes.

Analizamos a los 57 pacientes con glomerulopatía de trasplante de forma general. Las variables histológicas descriptivas y tiempos de supervivencia del injerto fueron recogidas en todos los pacientes.

Posteriormente se dividieron el total de los pacientes de la muestra en dos cohortes de pacientes en función del estado serológico VHC+ vs. VHC- estudiando ambos cohortes de forma separada y correlacionadas entre si. Se describieron 23 pacientes VHC+ y 30 VHC- lo que corresponde a un 40,4% y un 52,6% respectivamente. En 4 pacientes (7%) los datos no estuvieron disponibles. (*Gráfico 6*).

***Gráfico 6: Pacientes con Glomerulopatía del Trasplante***

■ VHC + ■ VHC- ■ Perdidos



## 1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE TODOS LOS PACIENTES CON GT:

### a) Estudio epidemiológico referente al receptor del trasplante:

#### a. Edad y sexo.

Del total de los 57 pacientes, la edad media del receptor en el momento del trasplante renal fue de  $44,4 \pm 15$  años (16-72). De ellos 22 fueron mujeres y 35 varones lo que corresponde a un 38,6% y 61,4% respectivamente (*Tabla 9*).

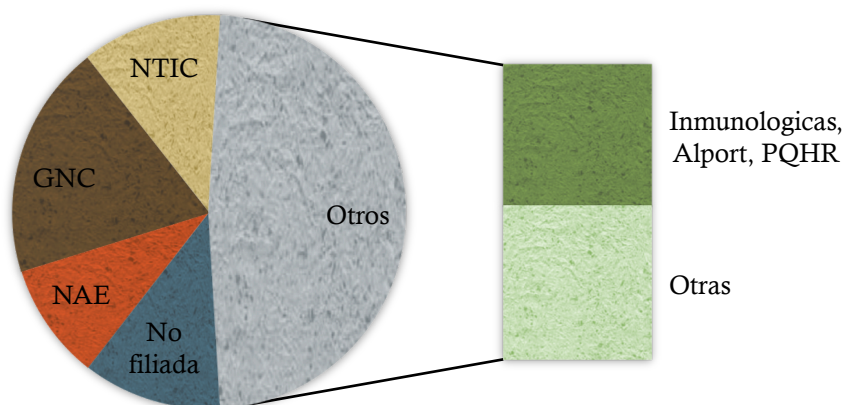
<b>Tabla 9: Variables Epidemiológicas: Glomerulopatía del Trasplante</b>		
	RECEPTOR	DONANTE
<b>Edad</b>	44,4 $\pm$ 15 años	42,7 $\pm$ 17,6 años
<b>Sexo</b>	35 (61,4%) varones	31 (64,6%) varones

#### b. Etiología de la insuficiencia renal.

Se recogieron las etiologías de la enfermedad renal de base que llevaron al paciente a la necesidad de terapia renal sustitutiva. Las patologías mas frecuente fue la de la glomerulonefritis crónica y la nefropatía tubulointersticial y crónica que la presentaron 10 (17,5%) y 6 (10,5%) pacientes respectivamente. Les siguió la Nefroangioesclerosis con 5 pacientes (8,8%) y la PQHR, Inmunológicas (Vasculitis y LES) y enfermedad de Alport en 4 pacientes (7%) y la DM con 3 pacientes (5,3%). (Gráfico 7).



**Gráfico 7: Etiología de la IRC que llevó al paciente a TRS**



**c. Estado serológico del receptor: (Tabla 10):**

<i>Tabla 10: Variables Serológicas en la Glomerulopatía del Trasplante.</i>		
	RECEPTOR	DONANTE
VHC+(RNA+)	23/53	7/47
VHB+	0/51	0/50
HIV+	0/51	0/50
IgG CMV+	36/42 (63,2%)	31/40 (54,4%)

**d) Terapia renal sustitutiva.**

En 42 pacientes (79,2%) los pacientes tuvieron en algún momento Hemodiálisis como técnica de terapia renal sustitutiva, y 15 (28,3%) Diálisis Peritoneal. De ellos el 7,5% de los pacientes recibieron ambas técnicas en la evolución de la enfermedad.

La media de tiempo en terapia renal sustitutiva antes de recibir el injerto renal (desde la entrada en hemodiálisis o desde la pérdida de su último

trasplante) que desarrolló la glomerulopatía del trasplante fue de  $5,1 \pm 5,5$  años.

De los pacientes que mantuvieron antes del trasplante función renal residual, la media de diuresis al día fue de  $0,46 \pm 0,5$  litros. Sólo 27 (47,4%) pacientes mantuvieron diuresis antes del trasplante. En 13 pacientes no se pudo obtener este resultado por falta de datos.

#### **b) Estudio epidemiológico referente al donante:**

##### **a. Edad y sexo.**

Del total de los 57 pacientes, la edad media del donante  $42,7 \pm 17,6$  años (14-80). De ellos 17 fueron mujeres y 31 varones lo que corresponde a un 29,8% y 54,4% respectivamente. Se desconoce este dato en 9 pacientes.

##### **b. Características del injerto donado:**

La mayoría de las donaciones provinieron de pacientes en muerte encefálica (83,3% del total de pacientes). El 14,6% de donación en asistolia y sólo 1 paciente fue donante de vivo.

En 6 pacientes (15,4% del total), el donante presentó fracaso renal agudo con una  $Cr > 1,3$  mg/dl. El tiempo medio de isquemia fría fue de  $18,95 \pm 6$  horas (2,25-30).

#### **c) Estudio de las variables inmunológicas:**

##### **a. Resultados relativos a la situación inmune del receptor. (Tabla 11).**

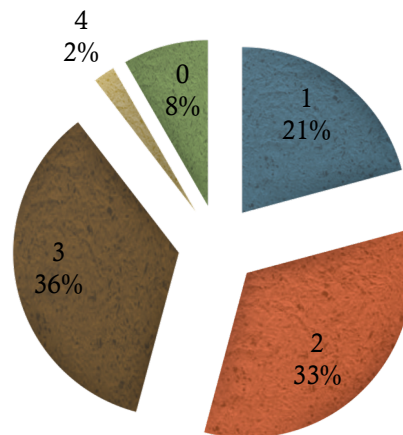
El número de transfusiones recibidas por los pacientes antes del trasplante fue de  $3,8 \pm 5$  (0-20). El porcentaje histórico máximo de anticuerpos frente a panel que presentó el receptor fue de más de un 50% sólo en 4

pacientes (9,3% del total). Estando hiperinmunizados en el momento del trasplante 3 pacientes del total (6,4%).

<b>Tabla 11: Situación inmunológica del receptor en la GT</b>	
<b>PRA históricos máximos &gt;50%</b>	4/43 (9,3%)
<b>%PRA previos al Tx</b>	6,45%±18,36 (rango 0% - 95%)
<b>Hiperinmunizado</b>	3/47 (6,4%)
<b>Anti-HLA I+</b>	14/36 (38,9%)
<b>Anti-HLA II+</b>	20/34 (58,8%)
<b>Primer trasplante</b>	37/51 (72,5%)
<b>Un trasplante previo</b>	11/51 (21,6%)
<b>Dos trasplantes previos</b>	3/51(5,9%)
<b>Número de transfusiones</b>	3,8±5 (rango 0-20)
<b>C4d+</b>	9/41 (15,8%)
<b>DSA+</b>	7/10 (12,3%)

En cuanto al número de trasplantes previos recibidos antes, en el 72,5% de los pacientes fue el primer injerto renal, en el 21,6% fue el segundo y en el 5,9% de pacientes ya habían recibido dos injertos renales previos siendo este su tercer trasplante.

El número de compatibilidades HLA entre el donante y receptor varió desde ninguna compatibilidad hasta un máximo de 4 compatibilidades, prevaleciendo la presencia de 3 compatibilidades HLA en un 35,4% de los casos. (*Ver gráfico 8*).

**Gráfico 8: Compatibilidades HLA**

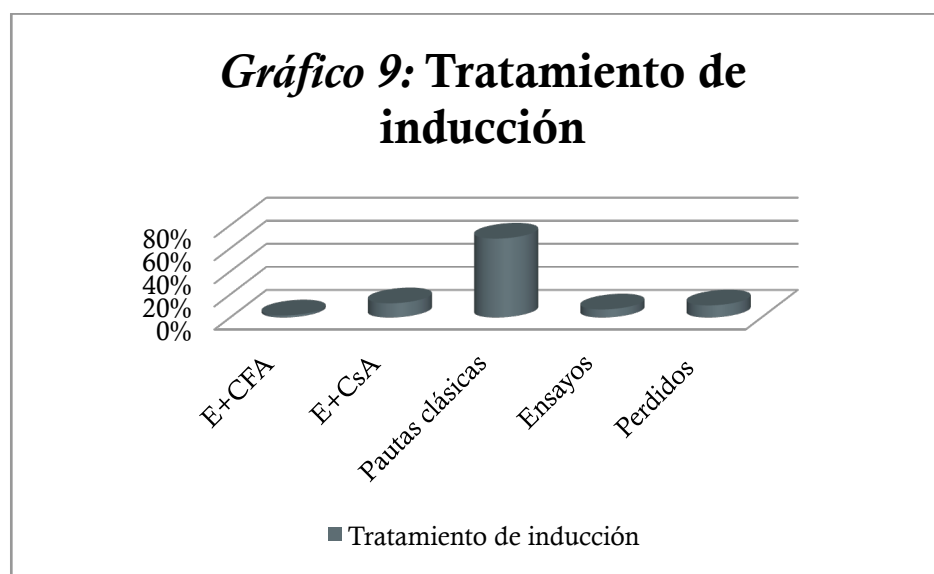
**b. Resultados relativos al tratamiento inmunosupresor de inducción.**

Teniendo en cuenta que la muestra de pacientes es amplia desde el punto de vista temporal, y que en la muestra estudiada hay pacientes que fueron trasplantados desde el año 1986, existen diferencias en las pautas terapéuticas realizadas en la inducción. En 6 pacientes (10,5%) el dato no estuvo disponible.

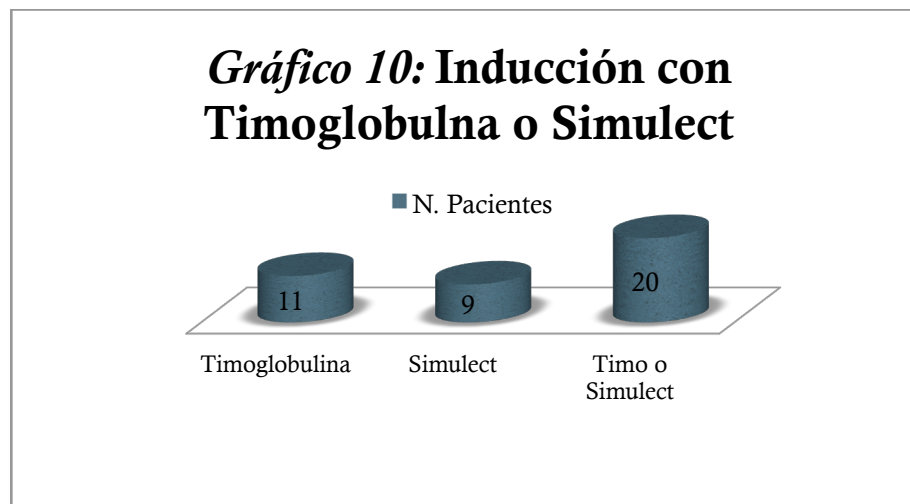
- Grupo de Pauta Clásica: en 39 pacientes (68,4%) se utilizaron las pautas clásicas en la inducción que fueron las que unían a la prednisona y al Micofenolato un anticalcineurínico, Ciclosporina o Tacrólimus. En 5 pacientes de este grupo se utilizó Azatioprina en lugar del Micofenolato y en otros 2 pacientes se asoció a la triple terapia Atgam.
  - Dosis de Prednisona: 0,5mg/Kg/día
  - Dosis de Prograf: 0,1-0.2mg/Kg/día
  - Dosis de Ciclosporina: 6-10mg/Kg/día
  - Dosis de Micofenolato: 500mg/12h

- Grupo de Ensayos Clínicos: 4 de los pacientes evaluados (7%) habían sido incluidos en estudios de diferentes ensayos clínicos:
  - Ensayo clínico Prednisona+Micofenolato: 2 pacientes
  - Ensayo clínico Prednisona+Ciclosporina+Certicam: 1 paciente
  - Ensayo clínico Prednisona+Rapamicina+Micofenolato: 1 paciente.
- Grupo de Prednisona y Ciclosporina: 7 pacientes (12,3%). Estos pacientes recibieron su trasplante renal entre los años 1990 – 1994.
- Un paciente con Ciclofosfamida y Atgam (1,8%), paciente que fue trasplantado en el año 1994.

En el *gráfico 9*, pasamos a describir las distintas terapias realizadas en los pacientes con sus porcentajes. 6 pacientes no fueron evaluados por no tener el dato disponible.



En el total de pacientes evaluados, 20 pacientes recibieron tratamiento con Timoglobulina o Simulect en la Inducción, lo que corresponde a un 39,2% de la muestra. En 11 pacientes se utilizó Timoglobulina (19,3%) y en 9 Simulect (15,8%) (*Gráfico 10*). En 6 (10,5%) y 11 (19,3%) de los pacientes el dato no estuvo disponible.



### c. Historia de rechazo agudo:

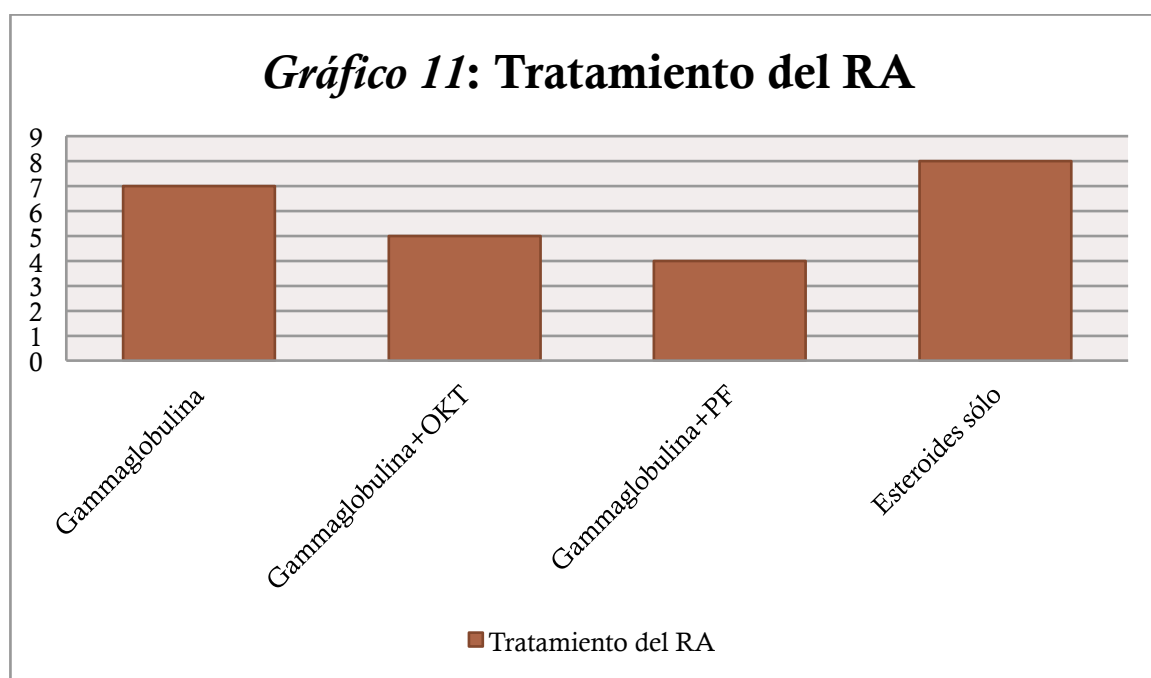
Del total de 57 pacientes de la muestra, 28 (49,1%) presentaron rechazo agudo diagnosticado en su evolución hasta el momento de la biopsia renal diagnóstica de GT. En 5 pacientes este dato no estuvo disponible.

De los 28 pacientes que presentaron rechazo agudo, se diagnosticaron 34 episodios, siendo éstos de tipo celular en 21 y vascular en 13. Lo que corresponde a un 36,8% y 22,8% respectivamente. En 6 pacientes se dieron los dos tipos de rechazo (*Tabla 12*).

<b>Tabla 12: Historia de Rechazo Agudo previo a la Glomerulopatía del Trasplante</b>	
<b>Pacientes con Rechazo agudo</b>	28 (53,84%)
<b>Episodios de RA Celular y/o Vascular</b>	34 (65,38%)
<b>Episodios de Rechazo por separado</b>	
<b>RA Celular</b>	21 (40,38%)
<b>RA Vascular</b>	13 (25%)

En cuanto al tratamiento del rechazo, las pautas no son homogéneas por la diferencia temporal de la muestra. De los 28 pacientes que presentaron rechazo agudo, recibieron Gammaglobulina 7 pacientes, gammaglobulina+OKT 5 pacientes, y gammaglobulina+PF 4 pacientes. El resto de pacientes que presentaron rechazo, fue tratado únicamente con bolus de esteroides.

En el *gráfico 11* se describen los tratamientos:



Tras el tratamiento del rechazo agudo se consiguió recuperación de la función renal en todos los pacientes, con una media de Cr tras el tratamiento de  $1,7\text{mg/dl} \pm 0,62$  (0,9-3,2).

#### d) Estudio de las variables clínicas de la evolución:

##### a. Resultados en el postrasplante inmediato:

La presencia de necrosis tubular aguda (NTA) en el postrasplante inmediato se diagnosticó en 26 pacientes, lo que corresponde a un 52% del

total. De ellos sólo 1 paciente no recuperó función renal, manteniendo Cr >2,5mg/dl (*Tabla 13*).

<b>Tabla 13: Función del injerto en el postrasplante inmediato. NTA</b>	
<b>n=57</b>	
<b>NTA</b>	<b>26 ptes. (52%)</b>
<b>Número de Hemodiálisis en NTA</b>	<b>2,2 sesiones (0-20)</b>
<b>0 sesiones</b>	<b>20 pacientes</b>
<b>1 sesión</b>	<b>20 pacientes</b>

#### **b. Estudio de las variables analíticas de la evolución:**

A fecha de fin de seguimiento el 30 de diciembre de 2014, un 56,1% (32 pacientes) de los pacientes diagnosticados de glomerulopatía del trasplante en el periodo de estudio habían entrado en hemodiálisis, un 5,2% ( 3 pacientes) fueron éxitos con injerto funcionante y un 31,6% (18 pacientes) seguían activos. 4 pacientes fueron pérdidas (7%) por ausencia de ese dato.

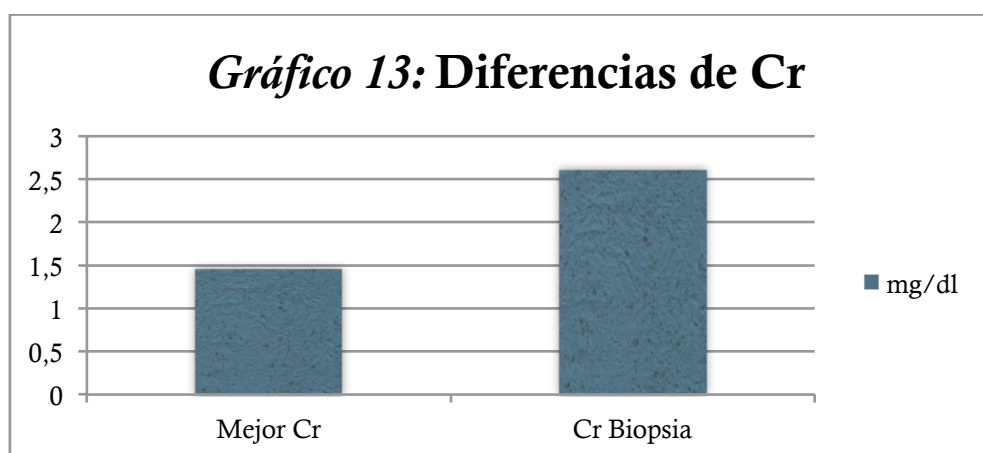
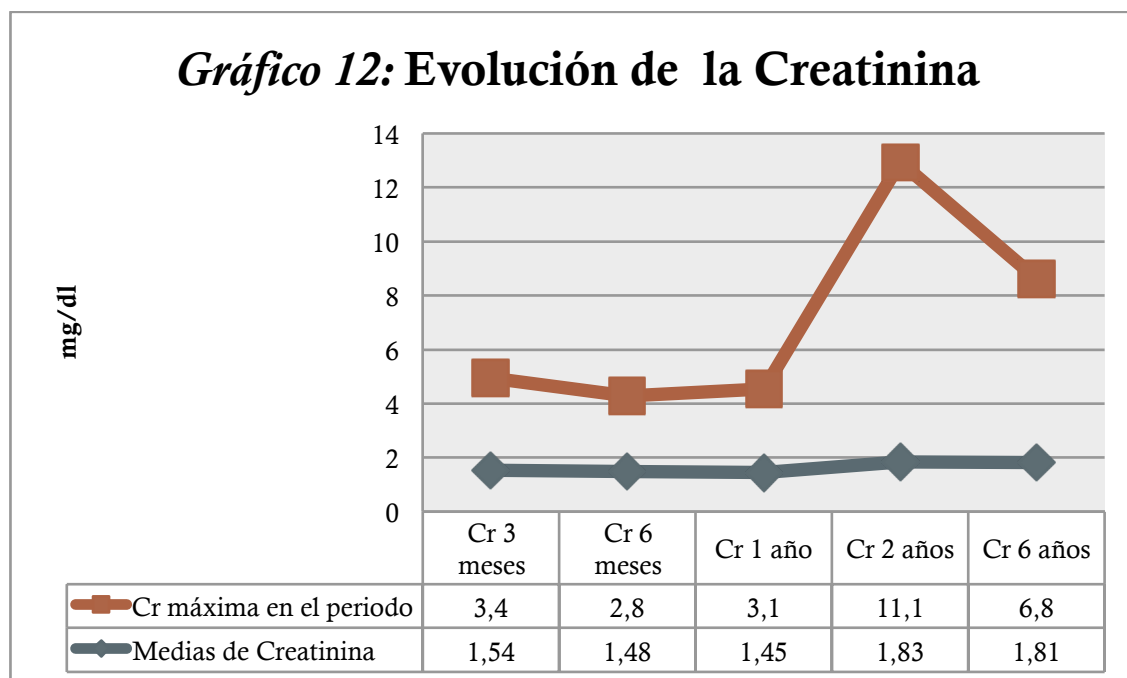
Se recogieron los datos analíticos de la evolución en el 3 y 6 mes postrasplante, al año, 2 años y 6 años o en su defecto hasta el deterioro clínico del injerto renal (expresado como aumento de Creatinina, Proteinuria o ambas como se explica en el aparatado material y métodos) que llevó a la realización de la biopsia diagnóstica. La evolución del parámetro Cr, Ccr y proteinuria se puede ver en los siguientes gráficos:

- Evolución de la Creatinina (mg/dl), desde el tercer mes postrasplante hasta, en su caso, los 6 años de evolución. Se evaluó la media de creatinina de los pacientes en el momento del deterioro que generó la



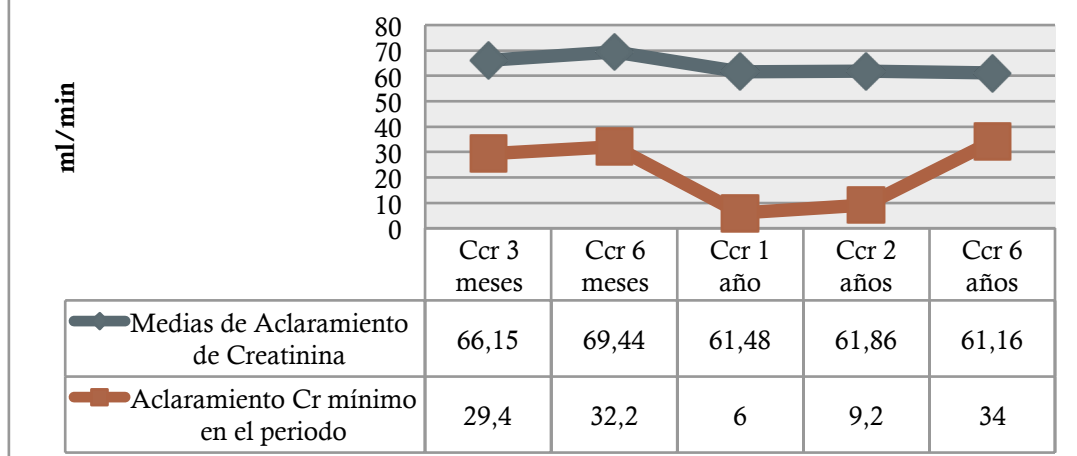
biopsia renal diagnóstica de GT, que fue de  $2,63 \pm 1,37$  mg/dl (1,17-8,5).

*G fico 12-13.*



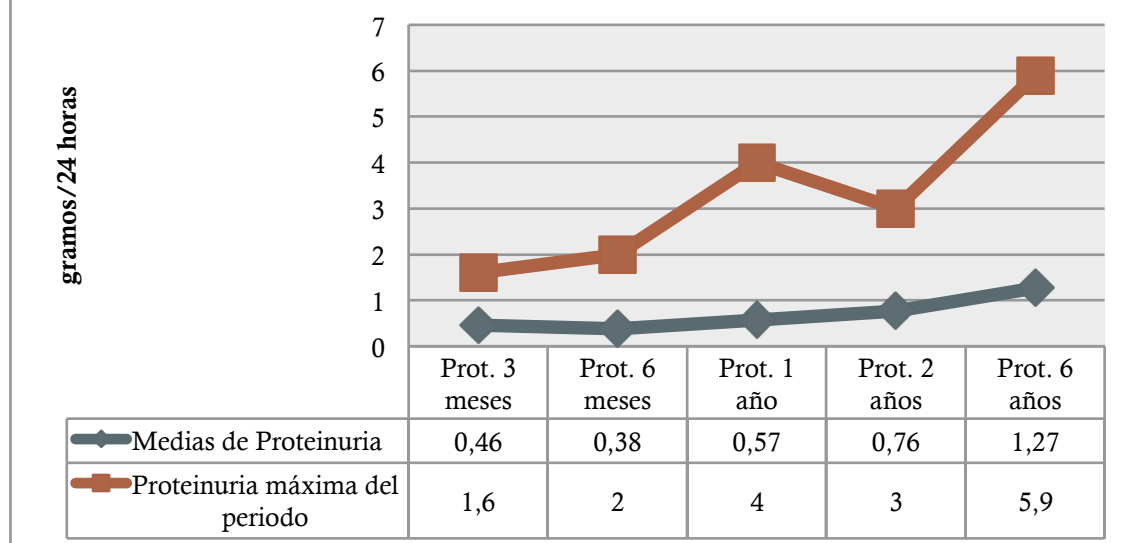
- Evolución del Aclaramiento de creatinina (Ccr)(ml/min), desde el 3er mes postrasplante hasta, en su caso, los 6  a os de evolución: *Gráfico 14.*

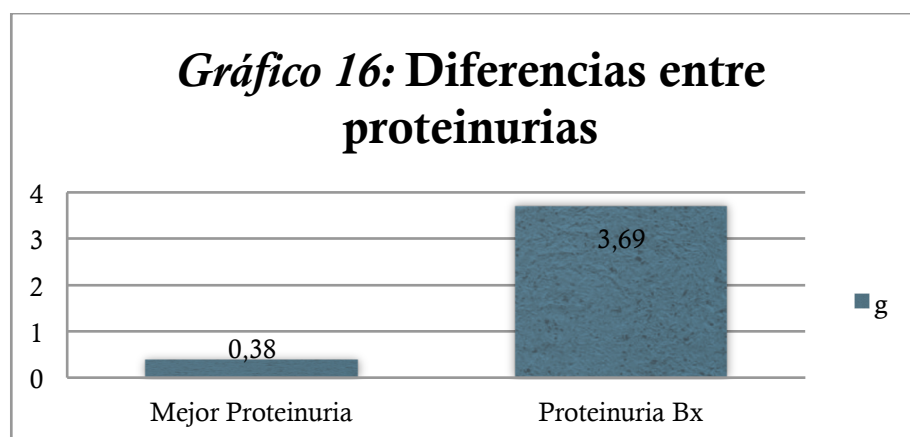
**Gráfico 14: Evolución del Aclaramiento de Creatinina**



- Evolución de la proteinuria (g/24h), desde el 3er mes postrasplante hasta, en su caso, los 6 años de evolución. Se evaluó la media de proteinuria de los pacientes en el momento del deterioro que generó la biopsia renal diagnóstica de GT, que fue de  $3,69 \pm 2,73$  mg/dl (0,2-12). Gráfico 15-16.

**Gráfico 15: Evolución de la Proteinuria**





**a. Tiempos de evolución:**

El tiempo medio de supervivencia del injerto en el total de los pacientes diagnosticados de GT fue de  $99,9 \pm 66,2$  meses (24-272).

Tres pacientes de la muestra fallecieron durante el periodo de seguimiento con injerto funcionando.

En cuanto al tiempo transcurrido desde el trasplante hasta la aparición del deterioro y consecuente realización de la biopsia renal diagnóstica de GT, fue de  $87,4 \pm 69,4$  meses (7-295) (Tabla 14). Evaluamos también el tiempo transcurrido desde el diagnóstico por biopsia de glomerulopatía del trasplante hasta la pérdida del injerto, siendo de  $9,76 \pm 10,7$  meses (0-37) evidenciando un corto periodo de supervivencia desde la realización del diagnóstico.

**Tabla 14: Tiempos de supervivencia del injerto**

Desde Tx a GT (Bx)	$87,4 \pm 69,4$ meses (7-295)
Desde GT (Bx) a HD	$9,76 \pm 10,7$ meses (0-37)

**e) Estudio de las variables histológicas:**

**a. Microscopía electrónica e inmunofluorescencia:** (Tabla 15).

Siendo fieles a los criterios diagnósticos histológicos de la GT, el 100% de los

pacientes presentaron en el estudio ultraestructural doble contorno de la membrana basal glomerular y ausencia de depósitos electrón-densos.

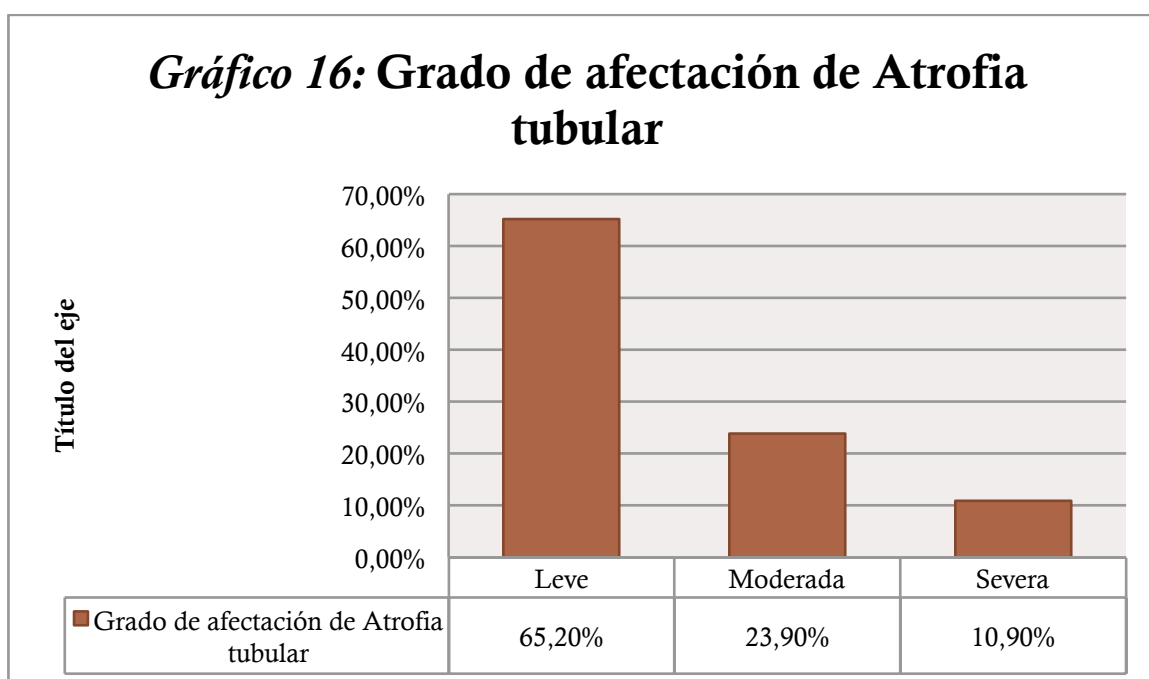
- Reduplicación de la membrana basal de los capilares peritubulares: en el estudio por ME destacamos la presencia de un 47,4% de las biopsias (un total de 27/57 muestras) con presencia de reduplicación de la membrana basal de los capilares peritubulares.
- Trombos: Se encontraron en el estudio por ME trombos glomerulares en 8/57 pacientes (14%).
- Ampliación de la lámina rara interna: fue descrita en un total de 33 pacientes (57,9%).
- Tumefacción endotelial: presencia en 20 pacientes y ausencia en 17 pacientes (35,1% y 29,8% respectivamente), con una ausencia del análisis de la misma en 20 pacientes.
- Vasculopatía: presencia evidenciada en 32 pacientes que corresponde a un 56,1% de la muestra. No se encontró evaluación diagnóstica de la misma en 6 pacientes que se contabilizaron como pérdidas.

**Tabla 15: Variables histológicas por ME. n=57**

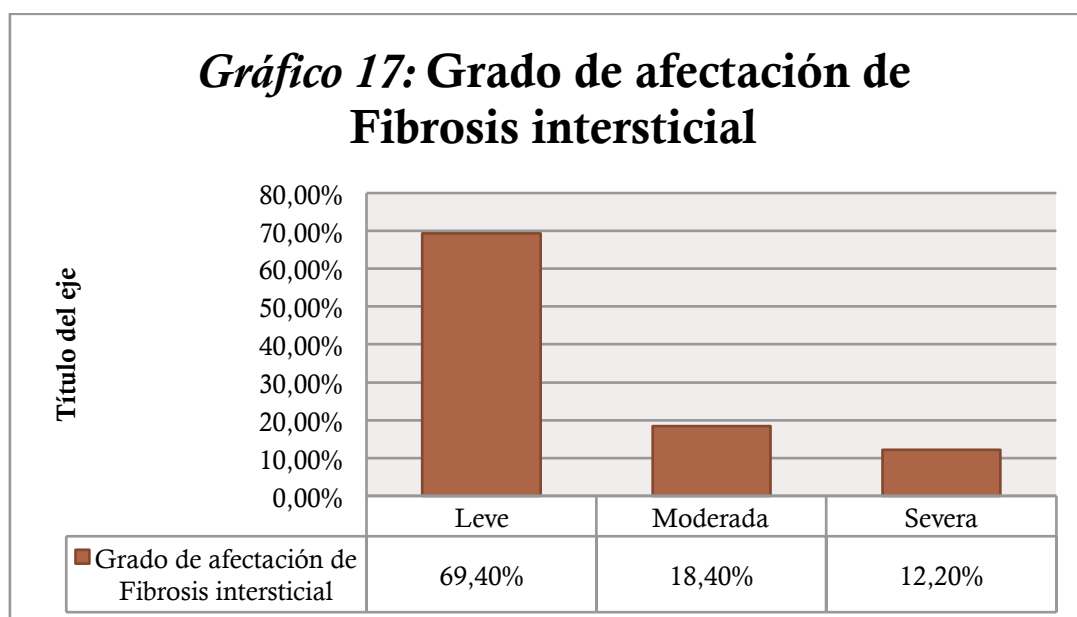
<b>Doble contorno MBG</b>	57 (100%)
<b>Ausencia de depósitos electrondensos</b>	57 (100%)
<b>Reduplicación MB Cap. periglomerulares</b>	27 (47,4%)
<b>Trombos</b>	8 (14%)
<b>Ampliación LRI</b>	33 (57,9%)
<b>Tumefacción endotelial</b>	20 (35,1%)
<b>Vasculopatía</b>	32 (56,1%)

b. **Microscopía óptica:** evaluamos la atrofia tubular y fibrosis intersticial y sus respectivos grados de afectación en leve, moderado y severo.

i. Atrofia tubular: del total de la muestra se evidenciaron 44 pacientes (77,2%) con presencia de atrofia tubular con un grado de afectación como se describe en el gráfico 16.



ii. Fibrosis intersticial: en cuanto a la fibrosis intersticial se evidenció en 46 pacientes (80,7%) con un grado de afectación evaluado en gráfico 17:



iii. Inmunohistoquímica: C4d: fueron analizados en 41 de los 57 pacientes (perdiéndose en el estudio 16 por no tener realizado el C4d en las muestras de biopsias). De ellos que sólo en 9 (15,8% del total) se obtuvo positividad par C4d. En el resto de pacientes analizados (32 pacientes) fue negativo (lo que corresponde a un 56,1% del total).

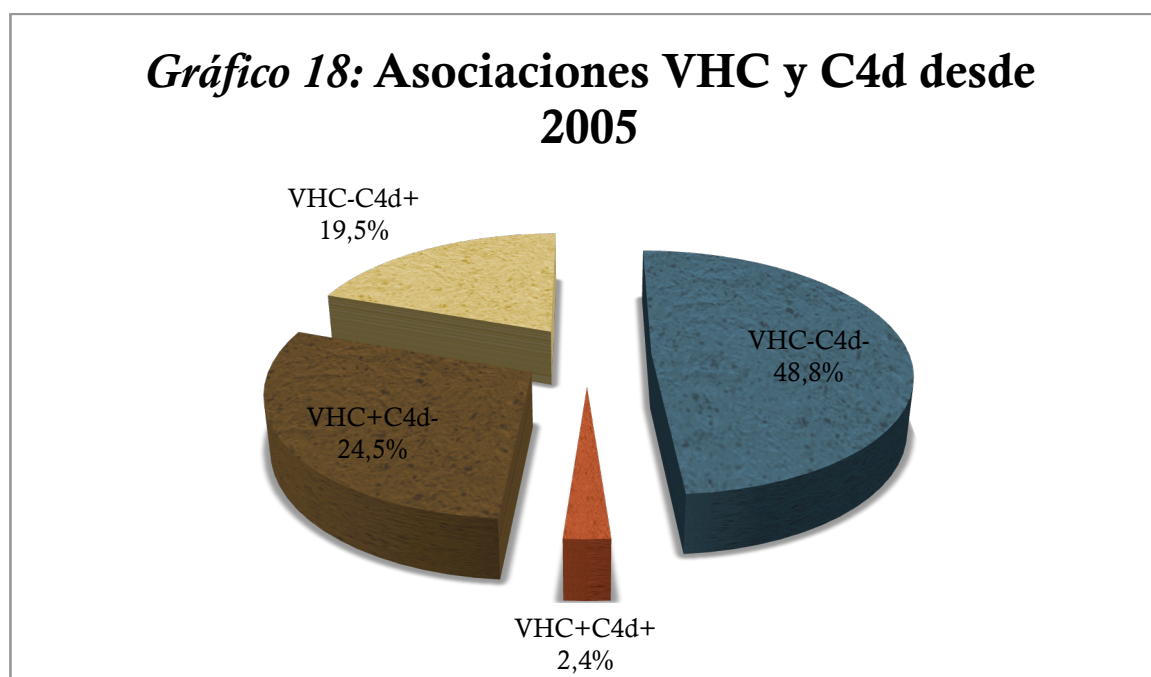
**f) Relación entre VHC y C4d en el estudio:**

De los 41 pacientes evaluables con datos de VHC+/- y C4d+/-, en 9 pacientes el C4d fue positivo, siendo en 32 pacientes negativo.

La proporción más frecuente fue la de pacientes VHC- y C4d- con 20 pacientes que corresponden a un 48,8% del total, seguido de los 12 pacientes VHC+ y C4d- , los 8 pacientes VHC- y C4d+ y 1 pacientes VHC+ y C4d+, correspondientes al 24,5%, 19,5% y 2,4% respectivamente (*Gráfico 18*).

No hubo diferencias significativas entre los grupos VHC+ y VHC- con DSA y C4d, pero si evidenciamos una tendencia a que ambos factores (DSA y

C4d) fueran más prevalentes en el grupo VHC- (8/9 pacientes fueron C4d+ HVC-, y 5/7 pacientes fueron DSA+VHC-), con una  $p>0,05$ .



Estudiamos el grupo de GT más frecuente, el de VHC- y C4d-, para evaluar si existía alguna diferencia significativa de este grupo con alguna de las variables estudiadas. Se evaluó con todas las variables, las inmunológicas, clínico-demográficas del donante y receptor, referentes trasplante y tratamiento inmunosupresor, antecedentes de rechazo agudo, histológicas etc. y no hubo asociación significativa en ningún caso.

## **2. COMPARACIÓN DE LAS COHORTES DE PACIENTES VHC+GT vs. VHC-GT:**

Los dos grupos de pacientes fueron similares en lo que respecta a características clínico-demográficas como edad, sexo, número de retrasplantes, inmunológicas como historia de rechazo agudo, estado de hiperinmunización al trasplante, transfusiones previas, situación de PRA frente

a panel, histológicas en general y serológicas en lo referente a la con infección por VHB, HIV o CMV.

Todos los pacientes en ambos grupos fueron seguidos hasta la entrada en hemodiálisis, muerte con injerto funcionante o activos a final del estudio el 30 de diciembre de 2014. Del total de los 57 pacientes no se encontró el dato serológico de VHC en 4, por lo que fueron pérdidas evaluando un total de 53 pacientes en esta parte del estudio de comparación.

Realizamos estudio de comparación de las variables entre los dos grupos tras evaluar la condición o no de normalidad de la muestra para decidir el uso de pruebas paramétricas o no en cada caso.

Entre los resultados que fueron más significativos destacamos:

a) Variables inmunológicas:

Existieron diferencias significativa entre los grupos VHC en cuanto al **tratamiento de inducción**, de tal manera que en el grupo de pacientes que recibieron menos tratamiento inductor predominaron los VHC+ con un 78,3% de los pacientes. En el grupo de pacientes que recibió en la inducción Timoglobulina o Simulect, predominaron los VHC- en un 53,6%, con una  $p < 0,05$  (*Tabla 16 y 17*).

TIMO O SIMULET	VHC-	VHC+	TOTAL
NO	13 (46,4%)	18 (78,3%)	31 (60,8%)
SI	15 (53,6%)	5 (27,1%)	51 (39,2%)
TOTAL	28 (100%)	23 (100%)	51 (100%)

**P<0,05**

*Tabla 16:* Uso de Timo o Simulect en la Inducción



<b>Tabla 17: Situación inmunológica del receptor. Diferencias VHC+/-</b>			
	VHC+ n=23	VHC- n=30	p
<b>PRA históricos máximos &gt;50%</b>	2 (13,3%)	2 (7,4%%)	0,6
<b>%PRA previos al Tx</b>	2,9 ±11	8,6±21	0,3
<b>Hiperinmunizado</b>	1 (5,3%)	2(7,1%)	1
<b>Primer trasplante</b>	15 (68,2%)	22 (75,9%)	NS
<b>Un trasplante previo</b>	5 (22,7%)	6 (20,7%)	NS
<b>Dos trasplantes previos</b>	2 (9,1%)	1 (3,4%)	NS
<b>Nº de compatibilidades HLA</b>	2,15±0,8	1,9±1	0,4
<b>Número de transfusiones</b>	4±4	3,6±5,7	0,8
<b>Inducción con Timo o Simulect</b>	5 (21,7%)	15 (53,6%)	<b>&lt;0,05</b>
<b>RA humoral-vascular</b>	4 (17,4%)	9 (30%)	0,25
<b>DSA +</b>	2 (66,7%)	5 (71,4%)	1
<b>C4d+</b>	1 (7,7%)	8 (28,6%)	0,22

**b) Diferencias con respecto injerto del donante:**

No hubo diferencias significativas cuando se realizó el estudio de comparación con ninguna de las variables referentes al donante. Tampoco con la presencia de NTA en el postrasplante inmediato (*Tabla 18*).

**Tabla 18: Diferencias con respecto al injerto del donante**

	VHC+	VHC-	p
<b>NTA en el postrasplante</b>	13 (59,1%)	13 (46,4%)	0,37

**c) Diferencias con respecto al estudio histológico:**

Existe tendencia a que los pacientes VHC+ tuvieran en MO mayor presencia de afectación de atrofia tubular y fibrosis intersticial que los VHC-. Se acerca a significativo en la atrofia tubular ( $p=0,06$ ) y es significativo en la fibrosis intersticial ( $p<0,05$ ) (Tabla 19).

a. **Grado de atrofia tubular** predominantemente moderada y severa en los VHC+ de forma significativa  $p<0,05$ .

i. Cuando evaluamos la supervivencia del injerto de los pacientes con GT y los dividimos según el grado de afectación de atrofia tubular (leve o moderado-severo), no se asoció significativamente a peor supervivencia en la muestra con afectación moderada-severa, pero si una clara tendencia a ello.

b. **Grado de fibrosis intersticial** predominantemente moderada y severa en los VHC+ no significativo con una  $p=0,3$

c. Se evidenció una tendencia a que los pacientes VHC - presentaran mayor descripción en la muestra de ME de reduplicación en la membrana basal de los capilares peritubulares, 16 pacientes VHC- frente a 8 pacientes VHC positivo respectivamente, pero esta relación no fue significativa con una  $p=0,1$ . No hubo diferencias en el resto de variables histológicas evaluadas en el estudio al compararla entre las dos cohortes de pacientes.

**Tabla 19: Diferencias con respecto al estudio histológico**

	VHC+ n=23	VHC- n=30	p
<b>Doble contorno MBG</b>	23 (100%)	30 (100%)	
<b>Depósitos electrondensos</b>	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Reduplicación MB Cap. periglomerulares</b>	8 (34,8%)	16 (53,3%)	0,17
<b>Trombos</b>	2 (8,7%)	2 (6,7%)	1
<b>Ampliación LRI</b>	14 (82,4%)	17 (77,3%)	1
<b>Tumefacción endotelial</b>	8 (44,4%)	11 (61,1%)	0,3
<b>Vasculopatía</b>	16 (50%)	16 (50%)	0,39
<b>ATROFIA TUBULAR</b>	22 (95,6%)	22 (73,3%)	<b>0,06</b>
<b>Grado moderado-severo de AT</b>	11 (50%)	5 (20,9%)	<b>&lt;0,05</b>
<b>FIBROSIS INTERSTICIAL</b>	22 (95,6%)	24 (80%)	<b>&lt;0,05</b>
<b>Grado moderado-severo de FI</b>	9 (39,1%)	6 (23%)	0,22

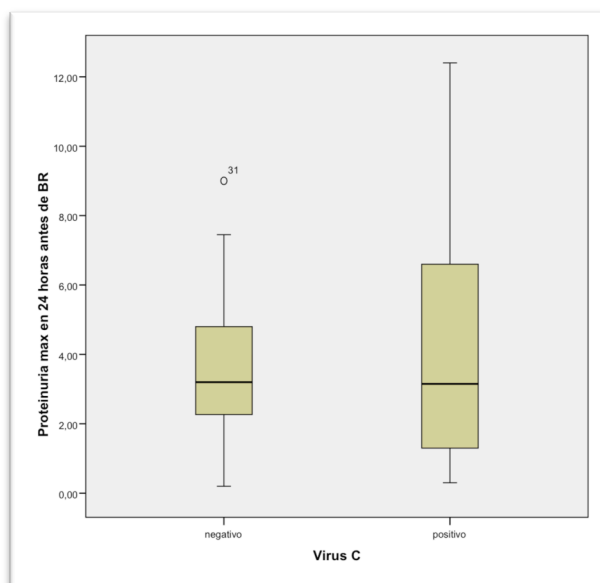
**d) Diferencias con respecto a las variables analíticas:**

No se encontraron diferencias en cuanto a las medias de creatinina, aclaramiento de creatinina y proteinuria de los pacientes VHC+ y VHC-. Destacar la proteinuria a los 6 años de seguimiento en la que con una  $p=0,08$  se evidencian proteinurias mayores de los pacientes VHC+ en que se diagnosticó la GT.

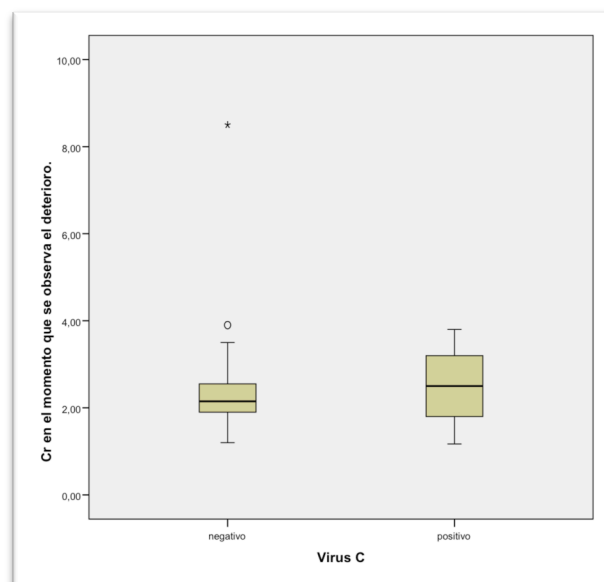
No se encontraron diferencias entre la creatinina y proteinuria en el momento del diagnóstico que generó la biopsia, con una media de Cr de  $2,76 \pm 1,46$ mg/dl en el grupo VHC+ y Cr  $2,52 \pm 1,31$ mg/dl en el grupo VHC-, y con una

media de proteinuria/24h de  $3,89 \pm 3,32$ g en el grupo VHC+ vs. proteinuria de  $3,53 \pm 2,2$ g en el VHC-. (Ver Box plot adjunto).

***Diferencias en la  
proteinuria al  
momento de la  
biopsia entre  
pacientes VHC+ y  
VHC-***



***Diferencias en la  
creatinina  
al momento de la  
biopsia entre  
pacientes VHC+ y  
VHC-***



**e) Diferencias con respecto al tiempo de función del injerto renal:**

No se encontraron diferencias significativas con respecto al tiempo de función del injerto desde el trasplante hasta el fin de seguimiento por cualquier causa, ni al momento de la biopsia renal ni desde el momento de la biopsia hasta el fracaso del injerto renal (*Tabla 20*).

	VHC-	VHC+	TOTAL
INJERTO ACTIVO A FIN DE SEGUIMIENTO	15 (50%)	6 (26,1%)	21 (39,6%)
INJERTO NO FUNCIONANTE A FIN DE SEGUIMIENTO	15 (50%)	17 (73,9%)	32 (60,4%)
TOTAL	30 (100%)	23 (100%)	53 (100%)

**P=0,07**

*Tabla 20.* Diferencias en la función del injerto desde el Tx hasta fin de seguimiento.

### **3. SUPERVIVENCIAS ENTRE GRUPOS VHC+ Y VHC-**

Todos los pacientes en ambos grupos VHC +/- fueron seguidos hasta el fallo del injerto vs activos hasta final del seguimiento o éxitus con injerto funcionante. Los resultados de los estudios de supervivencia los pasamos a detallar:

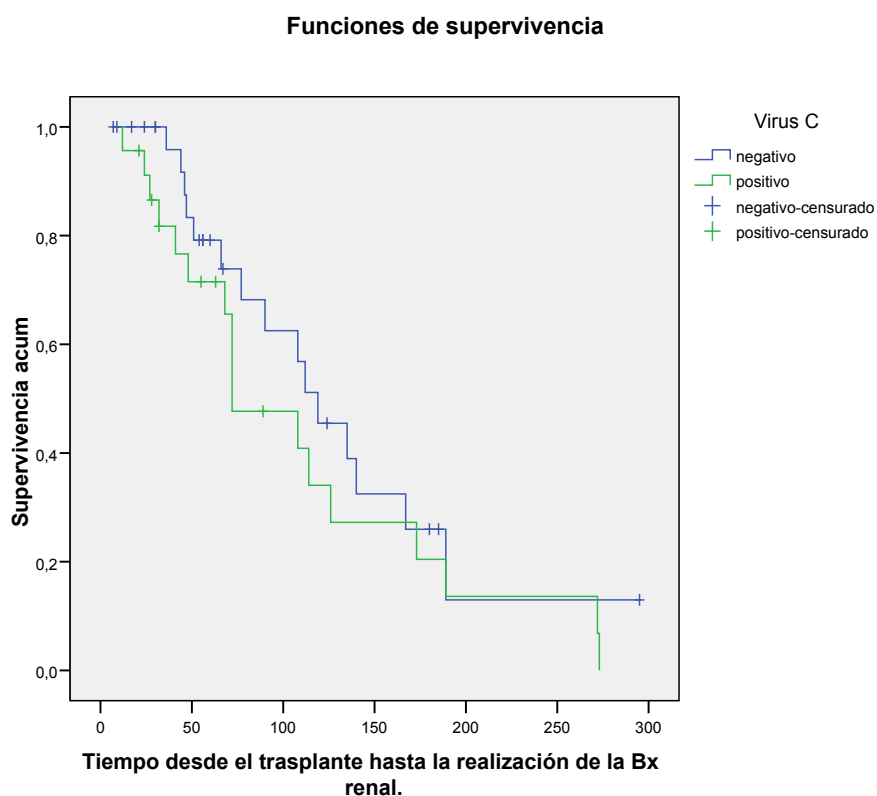
A lo largo del periodo de estudio desde 2000 a 2014, la supervivencia del injerto de los 57 pacientes diagnosticados de glomerulopatía del trasplante por microscopía electrónica fue de una media de  $104,9 \pm 73,52$  meses con un IC 95%(12-299).

Todos los pacientes de la muestra, separados en dos grupos en función de la presencia o no de VHC+, fueron seguidos hasta la progresión al fallo

renal y vuelta a diálisis vs. injerto funcionando + muerte por otra causa con injerto funcionando hasta el fin del seguimiento:

a) Supervivencia del injerto renal hasta la biopsia comparando grupo VHC+ y VHC-:

En el análisis de supervivencia por Kaplan-Meier hasta el momento de la biopsia renal diagnóstica de disfunción crónica del injerto, no hubo diferencias entre los grupos VHC+ y VHC- estando en 111,34 meses y los 133,16 meses de media respectivamente  $p=0,2$  log-rank test.



b) Supervivencia del injerto renal hasta el fin de seguimiento comparando VHC+yVHC-:

Analizada la supervivencia del injerto hasta el fin del seguimiento por cualquier causa, no encontramos diferencias significativas entre el grupo VHC+

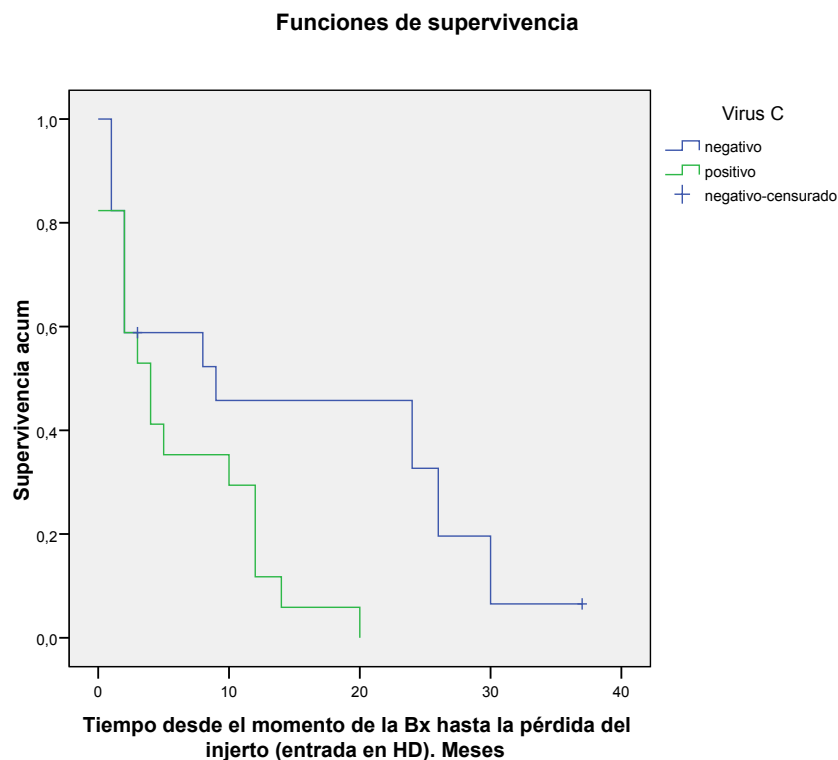
y VHC- en los pacientes con GT (sí que se encontraron diferencias significativas en el mismo estudio en la muestra de todos los pacientes con disfunción crónica del injerto)  $p=0,24$ , log-rank test.

La media en los pacientes VHC- fue de  $150,4 \pm 20,2$  meses con un IC 95%(110,8-189,9) y mediana  $121 \pm 11,5$  meses con un IC95%(98,4-143,6).

La media en los pacientes VHC+ fue de  $127 \pm 20,2$  con un IC 95%(87,5-166,7) y mediana  $108 \pm 28,3$  con un IC 95%(52,5-136,5)

**c) Supervivencia del injerto desde el diagnóstico de la biopsia renal hasta el fin de seguimiento comparando VHC+ y VHC-:**

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia del injerto en los pacientes con glomerulopatía del trasplante entre los dos grupos de pacientes VHC+ y VHC- desde el momento de la biopsia diagnóstica de disfunción crónica del injerto  $p<0,05$ , log-rank test.



La media en los pacientes VHC- fue de  $14,63 \pm 3,18$  meses con un IC 95%(8,3-20,8) y mediana  $9 \pm 10,39$  con un IC 95%(0-29).

La media en los pacientes VHC+ fue de  $6,1 \pm 1,45$  con un IC 95%(6,5-13,8) y mediana  $4 \pm 3,47$  con un IC 95%(1,3-6,6).



## ***VIII. DISCUSIÓN***

## VIII. DISCUSIÓN

El trasplante renal es el mejor tratamiento para los pacientes con enfermedad renal crónica terminal debido a que ofrece una mejor supervivencia frente a los pacientes en lista de espera de trasplante renal en hemodiálisis o diálisis peritoneal. Esto también se hace extensivo a los pacientes con enfermedad crónica por VHC+ como se verá más adelante.

La prevalencia de la infección crónica por virus de hepatitis C (VHC) en la población con enfermedad renal crónica es superior a la de la población general.<sup>57</sup> La mayoría de los pacientes receptores de trasplante renal adquieren la infección por VHC en relación con el tratamiento de hemodiálisis<sup>58,70</sup> y menos frecuentemente a través de la transfusión o el trasplante de órganos. La prevalencia de los anticuerpos anti-VHC detectados en pacientes en diálisis, estimados por ELISA, varía entre 3-10% en países desarrollados y entre el 15-75% en países en desarrollo.<sup>57</sup> La variación de esta prevalencia depende de varios factores como el centro hospitalario o clínica médica donde el paciente fue tratado, la etnia, el área geográfica, el tipo y la duración de la diálisis, el número de retrasplantes en el paciente, el número de transfusiones, la reactividad al antígeno VHBc y el uso de drogas de abuso iv.<sup>57</sup> Afortunadamente en los últimos años ha disminuido de manera significativa la frecuencia de infección por VHC durante la diálisis, lo que ha conllevado a un descenso en la tasa de infección VHC en los pacientes trasplantados. Un estudio mostró un progresivo y marcado descenso en la prevalencia de la infección VHC en España desde el 29,5% en 1990 al 10% en 1998.<sup>61</sup> El uso de y creación de protocolos en las medidas de higiene y estrategias relacionadas ha descendido la tasa de transmisión y en consecuencia la prevalencia de la infección VHC.

En la población general los pacientes con infección crónica por VHC

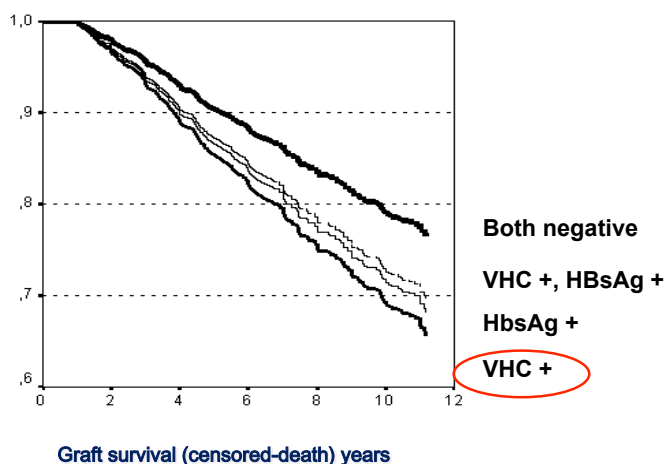
presentan más riesgo de enfermedad hepática (desarrollo de hepatitis crónica activa, cirrosis y hepatocarcinoma) y extrahepática, con posibilidad de generar patologías entre las que destacan la glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), crioglobulinemia mixta esencial (CME) y la porfiria cutánea tarda.<sup>101</sup>

Centrándonos en la afectación renal por el VHC+, como hemos dicho destaca la asociación de la infección crónica por VHC+ con el desarrollo de GNMP fundamentalmente, pero también se ha asociado con la GNM, con la GESyF, Nefropatía IgA, glomerulonefritis fibrilar inmunotactoide, microangiopatía trombótica y glomerulonefritis postrasplante renal.<sup>101</sup>

En los pacientes con infección crónica por VHC+ el trasplante renal está también considerado como la mejor opción terapéutica<sup>63,102</sup> con una menor mortalidad de los pacientes VHC+ que fueron trasplantados frente a los que permanecieron en diálisis o en la lista de espera de trasplante renal. Todo ello incluso habiéndose demostrado que la infección crónica del VHC+ en el paciente trasplantado se asocia con una disminución de la supervivencia del injerto (entre otras en relación con el desarrollo de disfunción crónica del injerto, diabetes relacionada con el VHC...) y del paciente, habiéndose descrito mayor mortalidad fundamentalmente de causa cardiovascular.<sup>57</sup>

En el estudio de Morales et al.<sup>61</sup> compararon 488 pacientes VHC+ con 2877 VHC-, encontrando un riesgo relativo (RR) para la pérdida del injerto de 1,53 ( $p<0,05$ ).

Las curvas de supervivencia de los pacientes trasplantados con infección por el virus de la hepatitis en España entre los años 1990-1998 fueron las siguientes:



Morales JM, Domínguez-Gil B et al. NDT, 2004

Similares resultados encontraron Bruchfield y Gentil y en el metanálisis de Fabrizi.<sup>94,103,104</sup>

Aún así, diversos autores han demostrado que los enfermos VHC+ que se trasplantan tienen mayor supervivencia que los que permanecen en la lista de espera.<sup>63,71,105</sup>

La infección crónica por VHC+ en el paciente trasplantado renal se ha visto relacionado con rechazo agudo, aparición de neoplasias extrahepáticas (trastornos linfoproliferativos postrasplante, mieloma)<sup>83,84</sup> y diabetes postrasplante fundamentalmente (NODAT- new-onset diabetes after renal transplantation). Además es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de diversas glomerulonefritis postrasplante, predominando, como en los riñones nativos, la GNMP con o sin crioglobulinemia, habiéndose descrito también su asociación con GNM<sup>91</sup>.

La Glomerulopatía del trasplante (GT) se caracteriza por ser una entidad anatomopatológica presente en los injertos renales de algunos pacientes trasplantados, y signo de mal pronóstico. Se ha relacionado con el rechazo crónico humoral (RCH)<sup>26</sup> manifestándose como deterioro progresivo de la función renal junto con proteinuria que puede llegar hasta el rango nefrótico. Recientemente se ha generado el interés sobre su relación con el VHC+, considerando la GT como un patrón morfológico debido a diferentes etiologías más que un patrón patognomónico del RCH.<sup>40</sup>

Nuestra tesis responde a la necesidad publicada entre otros por Hussain<sup>32</sup> y por Morales et al.<sup>100</sup> de investigar la relación entre GT y VHC en poblaciones más grandes con un diagnóstico histopatológico completo con ME.<sup>32</sup> Este método es el más idóneo para el diagnóstico de la GT.

Este es el primer trabajo que demuestra en una población de pacientes cuyas biopsias han sido estudiadas por microscopía electrónica, que la infección crónica por VHC+ es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la glomerulopatía del trasplante. Estos resultados corroboran lo ya publicado por Gloor et al. sobre la asociación del VHC + con la GNT en una muestra diagnosticada por MO con tinción de plata metenamina.<sup>30</sup>

### A. ESTUDIO DE LA COHORTE DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO:

En la primera parte de la discusión comentaremos los resultados referentes al estudio de los pacientes con Disfunción Crónica del Injerto (DCI).

Gloor et al.<sup>30</sup> publicaron en 2007 desde la Clínica Mayo, la presencia de una GT subclínica mediante una serie de biopsias de protocolo y por indicación analizadas retrospectivamente. En su artículo se demostró una fuerte asociación de la GT con la presencia de daño endotelial mediado por aloanticuerpos, fundamentalmente anti HLA II, y con la historia previa de rechazo agudo (RA). Asimismo, y a pesar de la relativa baja prevalencia de pacientes con VHC+ en su serie de GT, demostraron por primera vez la existencia de una asociación entre la GT y el VHC, mostrando al VHC como un factor de riesgo independiente ajustado con anti-HLA e historia de RA. Estos estudios fueron basados en análisis por microscopía óptica e IFI fundamentalmente, sin la existencia de un estudio ultraestructural.

Recientemente, el grupo de Baid-Agrawall et al.<sup>40</sup> realizó un estudio retrospectivo en el que 25 pacientes fueron diagnosticados de GT por microscopía óptica con una ausencia de depósitos inmunes analizado por IF y/o ME. De estos pacientes, 9 fueron VHC+, 12 presentaron C4d+ y 8 MAT. En este estudio se reportó una elevada prevalencia del VHC+ en pacientes con GT. Asimismo demostró de manera significativa que la presencia del VHC en los pacientes con GT se asociaba a una progresión más rápida hacia el fallo del injerto, sin poder demostrar este hallazgo en los casos de GT asociada a C4d y MAT. comparado con controles con nefrotoxicidad por anticalcineurínicos.

La GT es una lesión con un patrón morfológico, no patognomónico, asociado a VHC, RCH, MAT. Recientemente el grupo de Serón et al. refiere la

existencia también de una GT aislada sin componente humoral ni infección por VHC ni otras patologías evidenciadas hasta el momento.

Nuestro trabajo ahonda en todos los resultados descritos hasta el momento,<sup>30,40,50</sup> profundizando en la asociación VHC+GT+ y demostrándola de forma estadísticamente significativa, además de demostrar que el VHC+ es un potente factor de riesgo para desarrollar GT con una OR=7,20 en una muestra de pacientes con Disfunción Crónica del Injerto diagnosticados por ME.

La muestra analizada en nuestro estudio fue obtenida de biopsias realizadas por indicación. De las 119 que presentaron diagnóstico ultraestructural de disfunción crónica del injerto, 57 fueron GT+ con una presencia en este último grupo de 23/28 pacientes VHC+, lo que supone que un 82,1% de los pacientes con GT presentaban infección crónica por VHC+. En este punto es interesante recalcar que en nuestro centro de recogida de datos, históricamente se ha realizado un seguimiento muy estrecho a los pacientes trasplantados VHC+, de tal manera que ante la presencia de deterioro de creatinina, y/o aumento de proteinuria aun sin llegar al rango nefrótico, se han estudiado a los pacientes para descartar una glomerulopatía asociada a VHC vs. otra lesión a diagnosticar. Este hecho pudiera haber generado un sesgo en nuestra muestra que presenta una prevalencia de pacientes VHC+ GT+ más elevada de lo publicado hasta ahora en la literatura.<sup>30,50</sup>

Asimismo destacamos que en nuestro centro es habitual el estudio ultraestructural de las muestras de biopsia renal por anatomopatólogos especializados en el campo de la ME, lo que explica el mayor número de obtención de muestras diagnósticas de GT, que han podido diagnosticarse

desde estadios de afectación leve y que de otra forma pudieran haberse perdido en el estudio por microscopía óptica.

Estos dos ítems en nuestra serie; número de pacientes y fiabilidad diagnóstica, ofrecen una gran potencia a la asociación que demostramos entre el VHC y la GT, ya que sin ser un centro con biopsias de protocolo, hemos podido obtener una de las más grandes series publicadas sobre este problema tan importante.

El reconocimiento de esta asociación es de gran importancia en los pacientes con infección crónica por VHC+ en hemodiálisis, y en consecuencia en pacientes trasplantados renales, en los que con nuestros datos confirmamos que existe un elevado riesgo de que desarrollen GT. Este hecho es de especial importancia en los países con alta prevalencia de infección crónica por VHC en hemodiálisis, ya que en nuestro país, afortunadamente ha disminuido en los últimos años.

### **1. Relación aloinmunidad con GT+ en los pacientes con DCI:**

Diversos autores han demostrado asociación significativa de DSA, C4d+, anti-HLA (sobre todo clase II) y RA con la GT+, demostrando una relación causal entre la lesión crónica mediada por aloanticuerpos y la GT.<sup>30,46,106,107</sup>

Gloor et al. encontraron en una muestra de 55 GT de biopsias de protocolo, que la GT estaba altamente asociada a una alo sensibilización especialmente frente a los HLA II, concluyendo que la GT a menudo correspondía a un daño mediado por anticuerpos.<sup>30,108</sup>

El grupo de Boston, evidenció que el 89% de los pacientes GT+VHC- de su serie presentaban positividad para DSA, y en los pacientes GT+VHC+ no se encontró positividad para DSA en ningún caso.<sup>40</sup>



Recientemente el grupo de Messina M et al. en una muestra de 35 trasplantes renales con GT y C1q-DSA de novo, manifiestan dicha relación pero no demuestran asociación significativa con la supervivencia del injerto.<sup>109</sup>

Frente a estos resultados, como hemos comentado también, se han publicado series en las que en un 40-50% de los casos con GT+ no presentaron C4d y/o DSA, indicando que existía un proceso no mediado de forma inmunológica que podría generar GT en algunos pacientes.<sup>38,39,48</sup>

El grupo de Sis and Co-workers publicaron series de pacientes con GT+ con asociación con DSA pero no con C4d+. Igual situación demostró Louppy et al.<sup>47</sup> en injertos con glomerulitis y/o capilaritis peritubular con C4d-. Para explicar la presencia de DSA en ausencia de C4d+, se ha propugnado que la exposición crónica a niveles bajos de DSA podrían generar lesión en el endotelio debido a un grado de activación del complemento pero que fuera insuficiente para resultar en la detección del C4d+ por inmunohistoquímica.<sup>30,46</sup>

Continuando en esta línea de investigación pero con diferencias en el resultado, el grupo de Akalin et al. mostró en su serie de 36 pacientes con GT, que el 64% de los casos se desarrollaron en la ausencia de DSA y sólo se evidenció en un 11% depósito difuso de C4d+, planteando la posibilidad de un mecanismo alternativo no mediado por anticuerpos en la génesis de la GT en algunos pacientes.<sup>48</sup>

Varios artículos ahondan sobre el grupo de pacientes que desarrollan GT+ en ausencia de datos de rechazo mediado por anticuerpos, refiriendo que estos casos tendrían un mejor pronóstico dentro del grupo de GT+. Así, Torres IB analizaron el grupo de GT+ sin presencia de anti-HLA o C4d comparándolo con pacientes GT+ mediada por anticuerpos, encontrando menor inflamación crónica y mayor supervivencia en los primeros que en los segundos. En estos estudios no se evaluó el factor VHC+, al contrario que en nuestro estudio.<sup>110</sup>

En la comparación de los grupos GT+ GT- de los pacientes con disfunción crónica del injerto (DCI) de nuestra serie, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las variables epidemiológicas ni inmunológicas evaluadas (C4d, DSA, anti-HLA, historia de RA). Tampoco encontramos asociación significativa del C4d+ ni del DSA con la GT+.

El hecho de que la mayoría de factores inmunológicos no se asocien de manera significativa con la presencia de GT+ en nuestro estudio, genera una discrepancia con lo publicado en la literatura hasta ahora.<sup>30,46,107</sup> No obstante, destacar que sí evidenciamos una tendencia a mayor C4d, DSA e historia de RA en el grupo de GT+, aunque no significativo. Además en el análisis univariante sí demostramos, al igual que en otros estudios, que el DSA+ se asoció a la GT con una OR=1,5. Ignoramos si con un mayor tamaño muestral encontraríamos significación con todas las variables de aloinmunidad como en otros estudios.

Conjugando los resultados publicados en relación a la presencia del VHC+ en la GT+ con los de nuestra muestra, consideramos también que no es el mecanismo aloinmune en el seno de un rechazo crónico mediado por anticuerpos el único factor que genera la GT. Existen otros mecanismos como la infección crónica por VHC, que en series como la nuestra, demostramos que es el principal factor de riesgo, independiente de la etiología aloinmune, para el desarrollo de GT .

Tras estas aseveraciones queremos recalcar que nuestra serie, existe un error tipo b por baja potencia ya que al ser un estudio retrospectivo, los datos de C4d y DSA no fueron realizados en todos los pacientes, obteniendo pocos pacientes con resultado para las variables referidas en función al protocolo seguido para el estudio de rechazo crónico en nuestro centro.

## **2 Relación RA y GT+ en los pacientes con DCI:**

Centrándonos en la relación descrita entre el Rechazo Agudo (RA) celular, humoral/vascular o ambos con la GT, se demuestra en series publicadas que el RA es un factor de riesgo para desarrollar GT+ de forma significativa.<sup>30</sup>

En nuestro estudio, con un importante número de pacientes VHC+, no encontramos significancia en esta asociación: el antecedente de rechazo agudo postrasplante (humoral, celular, analizados por separado o ambos conjuntamente) no influyó de forma significativa en el desarrollo de GT+. La elevada prevalencia de VHC+ podría explicar nuestros datos por asociarse el VHC+ a menor incidencia de rechazo por un probable mecanismo de reducción en la tasa de linfocitos T helper junto a la alteración de la respuesta proliferativa.<sup>111</sup> Este punto lo desarrollaremos en esta discusión más adelante.

Concluyendo esta primera parte de estudio de 119 pacientes con disfunción crónica del injerto diagnosticada mediante ME, evaluamos los datos en el estudio multivariante, y corroborando lo expuesto, ningún otro factor estudiado aparte del VHC+ (RA, DSA, anti-HLA, C4d) se asocio significativamente con la GT+.

## **3. Supervivencia analizada en todos los pacientes con Disfunción Crónica del Injerto:**

La mayoría de publicaciones acerca de la supervivencia del injerto en los pacientes VHC positivos comparados con los VHC negativos han demostrado que los primeros presentan un riesgo relativo de pérdida del injerto mayor que los pacientes seronegativos.<sup>104</sup> Las causas más probablemente relacionadas con pérdidas del injerto en los pacientes VHC+ fueron la nefropatía crónica del trasplante fundamentalmente (NCT) y las glomerulonefritis.<sup>121</sup>

En nuestra serie de pacientes con DCI, los pacientes con VHC+ presentaron de forma significativa peor supervivencia del injerto desde el trasplante hasta el fin de seguimiento por cualquier causa, que los VHC-; 79 frente a 95 meses. Sin embargo, en nuestra muestra, no hubo diferencias en la mortalidad.

En la evaluación de la supervivencia del grupo DCI en función de GT+ o GT-, no encontramos diferencias significativas desde el momento del trasplante hasta hemodiálisis o pérdida del injerto, aunque sí una clara tendencia a una pérdida más precoz del injerto en el grupo GT+. No obstante, cuando evaluamos la supervivencia de estas dos cohortes GT+/GT- desde el momento del diagnóstico por biopsia, los pacientes GT+ sí perdían antes el injerto de forma significativa.

Los datos obtenidos indican que la supervivencia del injerto depende del daño histológico corroborando los datos expuestos por el grupo de DEKAF study.<sup>112</sup>

Con estos datos concluimos que la presencia de VHC+ es un factor de riesgo que se asocia a peor supervivencia del injerto desde el trasplante, probablemente generando un daño crónico que posteriormente podrá manifestarse como GT. Por otro lado, la presencia de GT+ sólo se asocia a peor supervivencia desde el momento del deterioro clínico en que se realizó la biopsia por indicación, no desde el momento del trasplante. Esto apoya lo ya publicado sobre que la GT es por sí misma un factor de riesgo para la pérdida del injerto con un tiempo de progresión desde la realización de la biopsia diagnóstica de GT hasta la vuelta a hemodiálisis menor de 2 años. Nuestros resultados fueron similares. En el análisis multivariante de los factores de riesgo para el tiempo de supervivencia del injerto renal hasta la pérdida del injerto o entrada en hemodiálisis, la única variable que influyó en el tiempo de supervivencia fue el VHC. El resto de variables C4d, DSA, no influyeron

significativamente. Datos que corroboran lo publicado por el grupo de Boston con una serie de menos pacientes.<sup>40</sup>

#### **B. ESTUDIO DE LA COHORTE DE PACIENTES CON GT:**

En la segunda parte del estudio comentamos las características de todos los pacientes con GT por ME.

Cosio et al.<sup>19,20</sup> evidenciaron en los años 90 asociación de GT y VHC+, con una prevalencia de VHC+ significativamente mayor en pacientes con GT que en los GT- (1,9 vs 33%, respectivamente). Los autores postularon que la infección VHC+, directa o indirectamente o por inducción de citoquinas como el IFN, pudiera inducir daño celular endotelial que eventualmente se expresase clínicamente con GT. Estos estudios sólo se realizó evaluación mediante MO, por lo que no se pudo distinguir bien entre la GT y la presencia de una GNMP sobre todo en los casos en los que existió glomerulitis.

La prevalencia de GT en nuestro estudio es del 47,89% de todos los pacientes con disfunción crónica del injerto evidenciados por ME. Esta es la serie más numerosa de pacientes en la que se ha demostrado presencia de GT con el mejor método diagnóstico para ello.

En otras series publicadas,<sup>30,40,46</sup> se llegó al diagnóstico de GT basándose en el estudio por MO, sin exigir diagnóstico ultraestructural, con imagen de doble contorno como principal ítem diagnóstico.

En el análisis de comparación entre las cohortes de pacientes VHC+ vs VHC- en la GT, sólo encontramos diferencias significativas en el uso de Timoglobulina o Simulect en la inducción al trasplante, en la presencia de Fibrosis Intersticial, en el grado de afectación moderado severo más frecuente

en los pacientes VHC+ y en la supervivencia y el tiempo de fallo del injerto entre los dos grupos VHC+ vs. VHC-.

La GT fue diagnosticada en un tiempo medio postrasplante de 87,4 meses (rango 7-295) con una media de Creatinina en sangre (Crs) de 2,63±1,37g/dl y proteinuria 3,69±2,73 g/24 horas en el momento del diagnóstico de GT en muestras de biopsia de injerto renal por indicación. Otras series muestran una media de Crs en el momento de la biopsia mayor, 4,4g/dl con biopsias de indicación, como en el grupo de Agrawal, con un similar grado de proteinuria, llegando en la mayoría de los casos al rango nefrótico.<sup>30,40</sup>

En general, la realización de biopsias por indicación, pueden llegar tarde al diagnóstico de GT.

No hubo diferencias significativas con respecto a la etiología que originó la enfermedad renal, ni en el tipo ni el tiempo de estancia en hemodiálisis o diálisis peritoneal entre los pacientes VHC+ y VHC- que desarrollaron la GT.

El 83,3% de las donaciones provinieron de donantes en muerte encefálica con una edad media de 42,7 (rango 14 a 80) años, sin diferencias entre los grupos de VHC+ vs VHC-. Sin embargo el grupo de Gloor sí encontró diferencias significativas referentes a la edad del donante, a diferencia de nuestra serie.<sup>30</sup>

Con respecto a la aloinmunidad, el porcentaje de anti-HLA positivos previo al trasplante de 68,6% (HLA I: 38,9% y anti HLA II 58,5%), con un 6,4% de pacientes hiperinmunizados. En otras series estos porcentajes fueron similares a los nuestros, con predominio de la presencia de anti HLA II, y con unos porcentajes de HLA totales en torno al 70%.<sup>46</sup> En nuestro caso no encontramos diferencias significativas entre anti-HLA y las cohortes VHC+ vs VHC-. Tampoco lo encontramos cuando comparamos el número de compatibilidades (3 compatibilidades en un 35,4% de los casos) o el número de

transfusiones recibidas (media de 3,8+-5 ; rango 0-20). La proporción de compatibilidades HLA fue la misma encontrada en la serie española publicada recientemente.<sup>61</sup> El grupo predominante fue el de pacientes receptores de un primer trasplante (72,5%), sin diferencias tampoco entre los grupos.

Pasamos a detallar los datos del estudio de variables inmunológicas:

### **1. Estudio de la relación RA en los pacientes con GT+::**

Existe controversia en cuanto a los datos que relacionan la influencia de la infección crónica por VHC+ con la incidencia del RA tras el trasplante renal. Varios grupos demostraron que los pacientes VHC+ se asocian a mayor historia de rechazo mientras que otros demostraron lo contrario.

Correll et al.<sup>111</sup> publicaron que la infección por VHC+ induce un estado de inmunodeficiencia en el paciente trasplantado basado en la reducción de la tasa de linfocitos T helper y a una alteración en su respuesta proliferativa. Estas alteraciones podrían explicar una disminución en la incidencia del RA que de hecho se ha publicado en varios grupos: de tal forma que Roth et al describieron una tasa de RA del 14,5% en pacientes con infección crónica por VHC+. <sup>70,105</sup> En controversia con esto, otras series han encontrado una similar o incluso mayor incidencia de RA en los pacientes VHC+. <sup>57</sup> Es preciso reconocer para explicar esta controversia, que las variables como tiempo en diálisis, trasplante previo, número de transfusiones se consideran también factores de riesgo para RA por la carga inmunológica que conllevan en sí mismas, lo que unido al VHC+, explicaría en estos casos una mayor prevalencia de RA que la esperada en un paciente VHC+ con la respuesta inmune alterada. <sup>113</sup> De hecho en el Estudio Nacional Español del Virus C, se evidencia mayor RA en los pacientes VHC+ porque hay un mayor número de segundos trasplantes e hiperinmunizados.

En nuestra serie de pacientes con GT+ no hubo diferencias significativas en cuanto a los episodios de RA. De acuerdo con la bibliografía publicada, dada nuestra alta prevalencia de VHC+, y la baja prevalencia de hiperinmunizados y segundos trasplantes, explicamos que en el estudio que presentamos exista menor presencia del RA que en otras series y no encontremos asociación estadísticamente significativa.

## **2. Estudio de la relación C4d+ y DSA+ con GT+:**

Cuando evaluamos la presencia de C4d (15,8%) y DSA (12,3%) en los pacientes de nuestra serie de GT, no encontramos diferencias entre los dos grupos VHC+/- . No obstante, comprobamos una clara tendencia a que los valores positivos tanto de C4d como de DSA se asociasen (de forma no significativa) con el grupo de pacientes VHC-. En total, un 20% de los pacientes VHC- de nuestra muestra fueron VHC-C4d+ frente a un 2% que fueron VHC+C4d+.

No podemos discutir con nuestra muestra estos resultados por ser pocos pacientes con C4d+, ya que como hemos dicho antes, adolece de una serie de datos por ser un estudio retrospectivo.

## **3. Relación conjunta del grupo VHC/C4d con GT:**

En nuestra serie de pacientes con GT, pudiera haberse esperado con los resultados referidos hasta ahora, que los pacientes que fueron serológicamente negativos para el VHC presentarían positividad para DSA o C4d en un porcentaje elevado. Esto sólo sucedió en nuestro estudio en un 20% de los casos y aunque sí se evidenció una tendencia a que los pacientes VHC- presentasen con mayor frecuencia C4d+ y/o DSA+ que el grupo de VHC+, esto no fue significativo.

Uno de los datos relevantes de nuestra serie es que un 48,4% de los pacientes presentó GT aislada (es decir fue VHC- C4d-), y sólo un 20%



presentó VHC- C4d+. Estos resultados están en la línea demostrada en la literatura que incide en la existencia de pacientes con GT sin que se haya encontrado factor etiológico para ello.<sup>31</sup> De nuevo volvemos a incidir en la idea de mecanismos alternativos aparte del VHC+ y la aloinmunidad, que influyeron en el desarrollo de la GT en nuestra serie.<sup>31,32,40,48</sup> Así lo propugnan también en la mayoría de las publicaciones sobre la GT.

A la GT se puede llegar por distintos mecanismos, y algunos no tienen hasta el momento, un factor etiológico asociado.

Con el fin de evaluar la existencia de otros factores etiológicos en nuestra serie, analizamos en el grupo VHC-C4d- con qué variable diferentes del VHC, C4d, anti-HLA y del C4d pudiera relacionarse. No encontramos relación significativa con ninguna de las variables estudiadas. Este hallazgo ha sido descrito como GT aislada (Isolated GT).

Nuestros resultados siguen y corroboran los resultados de la línea de investigación que concluye que la GT está generada por etiologías no excluyentes entre si, entre las que hay que dar protagonismo a la infección crónica por VHC+<sup>31,114</sup> sin olvidar que otros factores no determinados aún, aparte de los inmunológicos y del VHC+ pudieran estar generando la lesión de la GT que centra esta tesis.

En cuanto al tratamiento y evolución, teniendo en cuenta que la muestra de pacientes es amplia desde el punto de vista temporal, y que hay pacientes que fueron trasplantados desde el año 1986, evidenciamos diferencias de protocolo en las pautas empleadas en la inducción en el momento del trasplante renal. El grupo de mayor prevalencia fue el de los pacientes trasplantados desde el año 1995 en adelante, con la pauta Prednisona, anticalcineurínico y Micofenolato/Azatioprina en un 68,4%. No se encontraron

diferencias a este respecto entre las dos cohortes de VHC+ VHC-. No obstante sí que existieron diferencias cuando evaluamos el uso de cuádruple terapia con inducción con Timo o Simulect. Sólo se usó Timo o Simulect en 5 pacientes VHC+ y en 15 VHC- encontrándose diferencias significativas. Estos resultados precisarían para su confirmación de una nueva hipótesis que plantease si el uso de mayor inmunosupresión pudiera generar un factor protector frente a la GT en los pacientes VHC+ actuando como inhibidor del efecto lesivo de las citoquinas estimuladas por el VHC+ en el momento del trasplante. Serían necesarios estudios que corroboren este resultado en muestras prospectivas con datos completos de C4d y DSA y con pautas de inmunosupresión en la inducción homogéneas para poder llegar a una respuesta certera en este punto.

Referente a la evolución de los injertos en el postrasplante inmediato existió una prevalencia de 52% de pacientes con NTA postrasplante que precisaron una media de 2,2 sesiones (rango 0-20), sin diferencias tampoco entre los dos grupos. Cuando evaluamos la proteinuria y la función renal de los pacientes estudiados, no encontramos diferencias significativas entre los grupos VHC+ y VHC-, aunque si una clara tendencia a mayor proteinuria en el grupo VHC+.

Corroborando estos datos, en series publicadas sí se muestran diferencias estadísticamente significativas con mayor proteinuria en los pacientes VHC+ de la población general.<sup>30,115</sup> La no significación de nuestros resultados puede explicarse porque nuestra muestra es de pacientes con GT, cuya manifestación clínica en general en todos los pacientes independientemente de su estado serológico, es proteinuria y deterioro de función renal, al igual que la clínica de la lesión crónica por pacientes VHC+ de la población general con o sin GT. En este sentido, Bentall A et cols, publicó que la aparición de proteinuria un año después del trasplante sin evidencia de

GT pudiera predecir el desarrollo de GT 5 años después del trasplante en pacientes sensibilizados.<sup>116</sup>

Centrándonos en los datos histológicos de nuestro estudio, en todos los pacientes existió por definición, reduplicación de la membrana basal glomerular y ausencia de depósitos electrón-densos en base a los criterios exigidos en nuestro estudio. Todas las muestras fueron evaluadas por microscopía electrónica siendo el mayor estudio publicado con pacientes con GT diagnosticados por ME, lo que genera potencia a nuestros resultados y da respuesta a lo publicado sobre el diagnóstico de la GNT y la necesidad de ME en distintas series.<sup>32,100</sup>

Una de las principales lesiones histológicas, además de las referidas, que se presentan en las biopsias diagnosticadas de GT, es la reduplicación de la membrana basal de los capilares peritubulares, presente hasta en un 91% de los casos,<sup>46</sup> siendo un factor de apoyo al diagnóstico de la GT. Los depósitos de C4d en los capilares peritubulares de los injertos renales se han propugnado como marcadores in-situ de rechazo humoral agudo que se correlaciona fuertemente con la presencia de DSA.<sup>117</sup>

El grupo de Canadá, encontró que la presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares se asociaba fuertemente con la presencia de anticuerpos anti-HLA.<sup>26</sup> En nuestra serie no encontramos asociación significativa entre presencia de C4d+ y reduplicación de la membrana de los capilares peritubulares, probablemente por ser incompleta en cuanto a los resultados de la variable C4d como comentamos durante esta discusión.

Una de las características originales de nuestra serie es el hallazgo de la lesión de Fibrosis intersticial en relación con VHC+ de forma significativa. Este

hecho, que no había sido relacionado con el VHC+ puede ser debido a que el VHC genera más lesión temprana.

Asimismo, cuando evaluamos el grado de Atrofia Tubular, encontramos diferencias también significativas presentando los pacientes con VHC+ lesiones más severas que los VHC-. En este sentido el grupo DEKAF mostró cómo en el análisis de biopsias de protocolo los pacientes sin fibrosis ni inflamación tenían un pronóstico excelente a largo plazo, mientras que los pacientes con fibrosis e inflamación tenían un peor pronóstico.<sup>112</sup> En nuestra serie, cuando comparamos los pacientes con GT o sin GT y su grado de Atrofia Tubular, aunque sí evidenciamos una tendencia a peor supervivencia en pacientes con mayor grado de atrofia tubular, esto no fue significativo. Pero cuando lo estudiamos en los grupos VHC+ y VHC-, aquí sí encontramos de forma significativa que los pacientes VHC+ tenía mayor fibrosis intersticial y mayor gravedad en el grado de atrofia tubular con respecto a los VHC-.

Esto nos orienta a pensar que el VHC+ genera lesión histológica crónica sobre el injerto renal de forma más severa y que esto podría ser independiente de la generación de la GT. Esto apoyaría también los resultados sobre la peor supervivencia del injerto en los VHC+ frente a los VHC- publicada, sugiriendo una progresiva lesión crónica evidenciada con más grado de cronicidad expresada como fibrosis intersticial/atrofia tubular.<sup>67,100,118</sup>

#### **4. Supervivencia en todos los pacientes con Glomerulopatía del Trasplante:**

Seema Baid-Agrawal demostró en una serie de biopsias por indicación estudiando la relación VHC+ GT+, que el VHC+ fue el único factor de riesgo que se asoció con la velocidad en la progresión del fallo renal.<sup>40</sup> En su estudio esta relación no se evidenció con el C4d ni con la presencia de microangiopatía trombótica (TMA).

En nuestra serie la presencia del VHC+ en los pacientes GT empeoró la supervivencia de forma significativa desde el momento del diagnóstico, de tal forma que los pacientes GT+VHC+ perdían el injerto en una media de 6,1±1,45 meses desde la biopsia y los pacientes GT+VHC- lo perdían en 14,63±3,18 meses. Además, sólo el VHC+ se asoció a mayor progresión en la pérdida del injerto, no demostrándose de forma significativa con C4d, antiHLA ni DSA.

**En resumen, la lesión de la GT, es la más grave de las que se asocian al VHC+, con una evolución hacia la pérdida del injerto significativamente superior a la misma GT pero con VHC-.**

### **C. IMPORTANCIA DE LA ME:**

Por último es fundamental resaltar la importancia del ME en el diagnóstico de las biopsias de los pacientes trasplantados renales.<sup>119</sup>

Estudios recientes mostraron que la GT puede ser detectada de forma muy precisa por el ME incluso 1 mes postrasplante, cuando aún no se evidencia en el MO una lesión identificable de doble contorno.<sup>34,41</sup> Muchos centros no realizan estudio de ME en las biopsias de los injertos renales en parte por un clima social económicamente desfavorable y en parte porque puede existir en ciertos sectores de la comunidad científica la idea de que el ME no aporta más información a la ya generada con la MO y la IFI en una muestra de biopsia renal.<sup>32</sup> Esto pudiera ser real en algunos casos, pero se debería minuciosamente evaluar las biopsias renales en las que de forma inexorable debieran ser evaluadas por ME para un correcto diagnóstico. Así en la bibliografía anatómo-patológica, se describe la existencia de varios

diagnósticos histológicos para los que es necesaria la ME, entre las que se encuentra la GT, lesión histopatológica que centra nuestra tesis.<sup>29</sup>

Por otro lado, la presencia de doble contorno en la MO incluye otras entidades anatomopatológicas que hay que diferenciar de la GT, como son glomerulonefritis de novo o de recidiva con depósitos de inmunocomplejos (fundamentalmente la GNMP, asociada a la presencia de VHC en los riñones nativos e injertos renales), así como de la nefritis lúpica y la microangiopatía trombótica.<sup>29,32,40</sup> En las dos primeras, se obtiene en diagnóstico certero con el estudio por IFI y ME. El diagnóstico diferencial con la TMA, en presencia de trombos, precisa de una correlación clínica que descarte la presencia de síndrome hemolítico urémico o síndrome antifosfolípido que pudiera cursar con la misma lesión histológica que la GT con presencia de trombos intracapilares pero sin clínica de MAT.

En nuestro estudio, y movidos por querer optimizar una serie con diagnóstico por ME, evaluamos cuántos pacientes habrían sido diagnosticados de GT en el caso de que sólo hubiéramos tenido en cuenta los pacientes diagnosticados por MO, de tal manera que hubiésemos perdido un 15,5% de pacientes que sí cumplieron criterios por ME ya que en nuestro centro tenemos ese dato al realizarse de forma habitual los estudios ultraestructurales de la biopsias renales.

Similares datos se han publicado<sup>40</sup> propugnándose que la frecuencia real de la GT estaba infra-estimada por los pocos centros que realizaban biopsias de protocolo y generaban una pérdida de pacientes GT con afectación subclínica.<sup>6</sup> Nosotros, al igual que el grupo de William Hanf *et al.*<sup>117</sup> consideramos que frente al riesgo inherente a la realización de biopsias de protocolo para el diagnóstico de GT, habría que optar primero por seleccionar los pacientes cuyas características bien serológicas, bien inmunológicas,

pudieran predecir el desarrollo de GT, en los que se realizaría una biopsia con estudio por microscopía electrónica para diagnosticar de forma precoz la GT.

Con estos dos puntos queremos recalcar en esta tesis, la importancia de no infravalorar en la GT el papel del estudio por ME en esta patología.

#### D. LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

- En nuestro centro se realizan biopsias por indicación, condicionadas a un criterio clínico uniforme de proteinuria y/o deterioro de función renal en un mismo centro hospitalario donde se realizó la recogida de muestras.
- Siendo un estudio retrospectivo, no se ha podido completar la recogida de todos los datos en todos los pacientes, fundamentalmente las variables inmunológicas. En el centro hospitalario donde se recogieron los datos se comenzó a utilizar la inmunohistoquímica para el C4d en el año 2005. El estudio de anticuerpos donante específicos no se realizó en todos los casos por no estar establecido de forma protocolaria ante la disfunción crónica del injerto.
- Existencia de pacientes con estudio por MO en los que no se completó su estudio con ME, de los cuales podríamos haber encontrado algún falso negativo para GT.
- En nuestra serie las muestras por MO son evaluadas por profesionales diferentes a las muestras de ME.

Queremos resaltar que lo que aporta este trabajo de investigación es que por primera vez se describe que la infección activa por el VHC es un factor de riesgo independiente por la Glomerulopatía del Trasplante diagnosticada por Microscopía Electrónica, mostrando una menor supervivencia del injerto a partir del diagnóstico por biopsia, y menor aún cuando se asocia con VHC+, siendo esta la serie más larga publicada de injertos renales con Glomerulopatía del trasplante diagnosticada por Microscopía Electrónica.

Finalmente comentar que el acceso a los nuevos antivirales frente al VHC+ probablemente mejore los resultados con respecto a la aparición de la Glomerulopatía del Trasplante.



## ***IX. CONCLUSIONES***

## IX. CONCLUSIONES

1. La infección crónica por VHC en los pacientes con trasplante renal es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la glomerulopatía del trasplante (GT) definida mediante muestras examinadas con microscopía electrónica (ME).
2. La presencia de infección crónica por VHC+ en la GT, se asocia significativamente a una menor supervivencia del injerto desde el momento del diagnóstico, desarrollando insuficiencia renal crónica terminal en un tiempo medio menor de 7 meses desde la biopsia.
3. La supervivencia global de los injertos renales con disfunción crónica del injerto (DCI) es significativamente menor en los pacientes VHC+ comparados con los VHC-. Esta supervivencia también es significativamente menor en los pacientes con DCI desde el momento en que se diagnostica por biopsia de GT.
4. No objetivamos diferencias etiopatogénicas ni inmunológicas en la GT comparando los grupos VHC+ y VHC-..
5. Los injertos renales con disfunción crónica del injerto y GT se asociaron con el rechazo crónico mediado por anticuerpos en mayor número que los que no presentaron GT, aunque la diferencia no fue significativa. Sí se evidenció una tendencia a que las variables aloinmunes (C4d, DSA, anti-HLA) se asociaran más con los pacientes VHC- que con los VHC+, aunque sin significación estadística.

6. La GT está generada por etiologías no excluyentes entre sí, entre las que demostramos que el VHC+ es un factor de riesgo independiente. Hemos objetivado que hasta el 50% de los pacientes con diagnóstico de GT y VHC- fue C4d-, por tanto existe un alto porcentaje de GT aislada. Existen factores no determinados, aparte de los inmunológicos y de la infección crónica por VHC que pudieran estar generando este daño crónico.
7. La presencia de infección crónica por VHC en los pacientes con GT parece asociarse a una lesión con mayor fibrosis intersticial y con una mayor intensidad de atrofia tubular que la evidenciada en los pacientes VHC- con GT.
8. En nuestra serie, el uso del microscopio electrónico permitió diagnosticar un 15,5% más de casos de GT que los que hubiéramos diagnosticado por MO solamente, siendo por tanto la técnica diagnóstica de elección en esta patología.

## ***X. BIBLIOGRAFIA***

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Matesanz R, Miranda B. A decade of continuous improvement in cadaveric organ donation: the Spanish model. *J Nephrol*. 2002 Jan-Feb;15(1):22-8.
2. Matesanz R, Domínguez-Gil B. Organización del trasplante en España. In: Cuervas-Mons V, Alonso-Pulpon R, Morales JM, Sanchez Turrión V, eds. *Introducción al trasplante de órganos y tejidos*. Madrid, 2009:13-35.
3. Newsletter transplant. [www.ont.org](http://www.ont.org).
4. Serón D, Arias M, Campistol JM, Morales JM; Spanish Chronic Allograft Nephropathy Study Group. Late renal allograft failure between 1990 and 1998 in Spain: a changing scenario. *Transplantation*. 2003 Dec 15;76(11):1588-94.
5. Galichon P, Xu-Dubois YC, Finianos S, Hertig A, Rondeau E. Clinical and histological predictors of long-term kidney graft survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Jun;28(6):1362-70.
6. Akalin E, Murphy B: Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol* 13 (5): 572-576, 2001.
7. Elster EA, Hawksworth JS, Cheng O, Leeser DB, Ring M, Tadaki DK, Kleiner DE, Eberhardt JS 3rd, Brown TS, Mannon RB. Probabilistic (Bayesian) modeling of gene expression in transplant glomerulopathy. *J Mol Diagn*. 2010 Sep;12(5):653-63.
8. Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, Duquesnoy R, Fung J, Shapiro R y cols.: Biopsy of marginal donor kidneys: correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation* 69 (7): 1352-1357, 2000.
9. Cecka JM: The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 1998: 1-16, 1998.
10. Castañeda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V y cols.: Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 76 (1): 50-4
11. Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI. Arterial hypertension and

- renal allograft survival. *Jama* 283 (5): 633-638, 2000.
12. Modena FM, Hostetter TH, Salahudeen AK, Najarian JS, Matas AJ, Rosenberg ME: Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection. *Transplantation* 52 (2): 239-244, 1991.
  13. Roodnat JI, Mulder PG, Zietse R, Rischen-Vos J, Van Riemsdijk IC, JN IJ y cols.: Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 69 (8): 1704-1710, 2000.
  14. Orth SR, Ritz E, Schrier RW: The renal risks of smoking. *Kidney Int* 51 (6): 1669-77.
  15. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349 (24): 2326-2333, 2003.
  16. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D: Inadequate donor size in cadaver kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13 (8): 2152-2159, 2002.
  17. Tong CY, Bakran A, Peiris JS, Muir P, Herrington CS: The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation* 74 (4): 576-578, 2002.
  18. Gentil Govantes MA, Esforzado N, Cruzado JM, González-Roncero FM, Balaña M, Saval N, Morales JM. Harmful effects of viral replication in seropositive hepatitis C virus renal transplant recipients. *Transplantation*. 2012 Dec 15;94(11):1131-7.
  19. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Kanwal F, Dulai G. Post-transplant diabetes mellitus and HCV seropositive status after renal transplantation: meta-analysis of clinical studies. *Am J Transplant*. 2005 Oct;5(10):2433-40.
  20. Terasaki PI: Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 3 (6): 665-673, 2003.
  21. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A y cols.: Frequency and Clinical Implications of Development of Donor-Specific and Non-Donor-Specific HLA Antibodies after Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 16 (9): 2804-2812, 2005.
  22. Gjertson DW, Cecka JM: Living unrelated donor kidney transplantation. *Kidney Int* 58 (2): 491-499, 2000.

23. Opelz G: Impact of HLA compatibility on survival of kidney transplants from unrelated live donors. *Transplantation* 64 (10): 1473-1475, 1997.
24. López-Hoyos M, Fernandez-Fresnedo G, Rodrigo E, Ruiz JC, Arias M: Effect of delayed graft function in hypersensitized kidney transplant recipients. *Hum Immunol* 66 (4): 371-377, 2005.
25. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):713-23.
26. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickeleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):708-14.
27. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM, Serón D. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant.* 2006 Apr;6(4):747-52.
28. Herrera GA, Isaac J, Turbat-Herrera EA. Role of electron microscopy in transplant renal pathology. *Ultrastruct Pathol.* 1997 Nov-Dec;21(6):481-98
29. Brealey J. Transplant renal biopsies. In: Stirling JW, Curry A, Eyden B, eds, *Diagnostic electron microscopy*. Malaysia, 2013: 55-88
30. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, Griffin MD, Larson TS, Cosio FG. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant.* 2007 Sep;7(9):2124-32.
31. Haas M. Transplant glomerulopathy: it's not always about chronic

- rejection. *Kidney Int.* 2011 Oct;80(8):801-3.
32. Husain S, Sis B. Advances in the understanding of transplant glomerulopathy. *Am J Kidney Dis.* 2013 Aug;62(2):352-63.
  33. Dobi D, Bodó Z, Kemény É, Boda K, Szenohradszky P, Szederkényi E, Laszik ZG, Iványi B. Morphologic Features and Clinical Impact of Arteritis Concurrent with Transplant Glomerulopathy. *Pathol Oncol Res.* 2015 Jul 23.
  34. Wavamunno MD, O'Connell PJ, Vitalone M, Fung CL, Allen RD, Chapman JR, Nankivell BJ. Transplant glomerulopathy: ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies. *Am J Transplant.* 2007 Dec;7(12):2757-68.
  35. Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Stegall MD. Transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2008 Mar;8(3):492-6.
  36. Mahmoud IM, Elhabashi AF, Elsayy E, El-Husseini AA, Sheha GE, Sobh MA. The impact of hepatitis C virus viremia on renal graft and patient survival: a 9-year prospective study. *Am J Kidney Dis.* 2004 Jan;43(1):131-9.
  37. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008 Apr;8(4):753-60.
  38. Racusen L. Chronic transplant glomerulopathy: need for further assessment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Nov;2(6):1108-9.
  39. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Apr;18(4):1046-56.
  40. Baid-Agrawal S, Farris AB 3rd, Pascual M, Mauiyyedi S, Farrell ML, Tolckoff-Rubin N, Collins AB, Frei U, Colvin RB. Overlapping pathways to transplant glomerulopathy: chronic humoral rejection, hepatitis C infection, and thrombotic microangiopathy. *Kidney Int.* 2011 Oct;80(8):879-85.



41. Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2011 Oct;11(10):2123-31.
42. Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, Dekker FW, Benediktsson H, Bajema IM, Bruijn JA, Paul LC. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int.* 2004 Jun;65(6):2409-18.
43. Kieran N, Wang X, Perkins J, Davis C, Kendrick E, Bakthavatsalam R, Dunbar N, Warner P, Nelson K, Smith KD, Nicosia RF, Alpers CE, Leca N, Kowalewska J. Combination of peritubular c4d and transplant glomerulopathy predicts late renal allograft failure. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Oct;20(10):2260-8.
44. Satoskar AA, Lehman AM, Nadasdy GM, Sedmak DD, Pesavento TE, Henry ML, Pelletier RP, Ferguson RM, Nadasdy T. Peritubular capillary C4d staining in late acute renal allograft rejection--is it relevant? *Clin Transplant.* 2008 Jan-Feb;22(1):61-7.
45. Corrêa RR, Machado JR, da Silva MV, Helmo FR, Guimarães CS, Rocha LP, Faleiros AC, dos Reis MA. The importance of C4d in biopsies of kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:6781-80.
46. Sis B, Campbell PM, Mueller T, Hunter C, Cockfield SM, Cruz J, Meng C, Wishart D, Solez K, Halloran PF. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant.* 2007 Jul;7(7):1743-52.
47. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, Martinez F, Thervet E, Méjean A, Charron D, Duong van Huyen JP, Bruneval P, Legendre C, Nochy D. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* 2009 Nov;9(11):2561-70.
48. Akalin E, Dinavahi R, Dikman S, de Boccardo G, Friedlander R, Schroppel B, Sehgal V, Bromberg JS, Heeger P, Murphy B. Transplant glomerulopathy may occur in the absence of donor-specific antibody and C4d staining. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Nov;2(6):1261-7.

49. Baid S, Pascual M, Williams WW Jr, Tolkoﬀ-Rubin N, Johnson SM, Collins B, Chung RT, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB. Renal thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibodies in hepatitis C-positive renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jan;10(1):146-53.
50. Cosio FG, Roche Z, Agarwal A, Falkenhain ME, Sedmak DD, Ferguson RM. Prevalence of hepatitis C in patients with idiopathic glomerulopathies in native and transplant kidneys. *Am J Kidney Dis*. 1996 Nov;28(5):752-8.
51. Ghany M, Strader D, Thomas D, and Seeﬀ L. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-1374.
52. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet* 2005;5(9):558-67.
53. [www.cdc.gov/spanish/](http://www.cdc.gov/spanish/). Centro de control de las enfermedades y prevención de los Estados Unidos.
54. Covic A, Abramowicz D, Bruchfeld A, Leroux-Roels G, Samuel D, van Biesen W, Zoccali C, Zoulim F, Vanholder R; ERA-EDTA ERBP Advisory Board. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) hepatitis C guidelines: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:719–727.
55. M. Houghton. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009;51:939–948.
56. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood– borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–362.
57. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2008 Apr;(109):S1-99
58. Pereira BJ, Levey AS. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int*. 1997 Apr;51(4):981-99.

59. Morales JM, Campistol JM. Transplantation in the patient with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jul;11(7):1343-53.
60. Jadoul M, Poignet JL, Geddes C, Locatelli F, Medin C, Krajewska M, Barril G, Scheuermann E, Sonkodi S, Goubau P; HCV Collaborative Group. The changing epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection in haemodialysis: European multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Apr;19(4):904-9.
61. Morales JM, Domínguez-Gil B, Sanz-Guajardo D, Fernández J, Escuin F. The influence of hepatitis B and hepatitis C virus infection in the recipient on late renal allograft failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jun;19 Suppl 3:72-6.
62. Baid-Agrawal S, Schindler R, Reinke P, Staedtler A, Rimpler S, Malik B, Frei U, Berg T. Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients. *J Hepatol*. 2014 May;60(5):928-33.
63. Bloom RD, Sayer G, Fa K, Constantinescu S, Abt P, Reddy KR. Outcome of hepatitis C virus-infected kidney transplant candidates who remain on the waiting list. *Am J Transplant*. 2005 Jan;5(1):139-44.
64. Campistol JM, Esforzdo N, Barrera JM, Morales JM, Oppenheimer F. Hepatitis C virus-positive patients on the waiting list for transplantation: study, evaluation and treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 8:68-70.
65. Moreira R, Pinho JR, Fares J, Oba IT, Cardoso MR, Saraceni CP, Granato C. Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. *Can J Microbiol*. 2003 Aug;49(8):503-7.
66. Morales JM, Marcén R, Andres A, Domínguez-Gil B, Campistol JM, Gallego R, Gutierrez A, Gentil MA, Oppenheimer F, Samaniego ML, Muñoz-Robles J, Serón D. Renal transplantation in patients with hepatitis C virus antibody. A long national experience. *NDT Plus*. 2010 Jun;3(Suppl\_2):41-46.
67. Morales JM, Munoz MA, Castellano G, Colina F, Fuertes A, Andres A, Campo C, Blasco A, Hernandez E, Rodicio JL. Impact of hepatitis C in

- long-functioning renal transplants: a clinicopathological follow-up. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 2):1450-3.
68. Morales M, Campo C, Castellano G, Colina F, Andres A, Fuertes A, Praga M, Rodicio JL. Clinical implications of the presence of antibodies to hepatitis C after renal transplantation. *Transplant Proc.* 1992 Feb;24(1):78-80.
69. Baid-Agrawal S, Pascual M, Moradpour D, Frei U, Tolckoff-Rubin N. Hepatitis C virus infection in haemodialysis and kidney transplant patients. *Rev Med Virol.* 2008 Mar-Apr;18(2):97-115
70. Roth D. Hepatitis C virus: the nephrologist's view. *Am J Kidney Dis.* 1995 Jan;25(1):3-16.
71. Pereira BJ, Natov SN, Bouthot BA, Murthy BV, Ruthazer R, Schmid CH, Levey AS. Effects of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease. The New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1374-81.
72. Manuel O, Baid-Agrawal S, Moradpour D, Pascual M. Immunosuppression in hepatitis C virus-infected patients after kidney transplantation. *Contrib Nephrol.* 2012;176:97-107.
73. Alric L, Di-Martino V, Selves J, Cacoub P, Charlotte F, Reynaud D, Piette JC, Péron JM, Vinel JP, Durand D, Izopet J, Poynard T, Duffaut M, Rostaing L. Long-term impact of renal transplantation on liver fibrosis during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2002 Nov;123(5):1494-9.
74. Izopet J, Rostaing L, Sandres K, Cisterne JM, Pasquier C, Rumeau JL, Duffaut M, Durand D, Puel J. Longitudinal analysis of hepatitis C virus replication and liver fibrosis progression in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2000 Mar;181(3):852-8.
75. Kamar N, Rostaing L, Selves J, Sandres-Saune K, Alric L, Durand D, Izopet J. Natural history of hepatitis C virus-related liver fibrosis after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Jul;5(7):1704-12.
76. Cruzado JM, Bestard O, Grinyó JM. Impact of extrahepatic complications (diabetes and glomerulonephritis) associated with hepatitis

- C virus infection after renal transplantation. *Contrib Nephrol.* 2012;176:108-16
77. Kamar N, Izopet J, Ribes D, Rostaing L. [Hepatitis C virus infection in renal-transplant patients]. *Nephrologie.* 2004;25(1):9-15.
78. Boyce NW, Hayes K, Gee D, Holdsworth SR, Thomson NM, Scott D, Atkins RC. Cytomegalovirus infection complicating renal transplantation and its relationship to acute transplant glomerulopathy. *Transplantation.* 1988 Apr;45(4):706-9.
79. Morales JM. Hepatitis C virus infection and renal transplantation. *Transplant Proc.* 1999 Sep;31(6):2221-4.
80. López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Morales JM, San-Juan R, Cervera C, Carratalá J, Torre-Cisneros J, Gavalda J, Muñoz P, Len O, Martín-Dávila P, Ramos A, Montejo M, Lumbreras C, Moreno A, Aguado JM; Spanish Network for the Research of Infection in Transplantation/Network of Research in Infectious Diseases (RESITRA/REIPI) Study Group. Impact of hepatitis C virus infection on the risk of infectious complications after kidney transplantation: data from the RESITRA/REIPI cohort. *Transplantation.* 2011 Sep 15;92(5):543-9.
81. Mitwalli AH, Alam A, Al-Wakeel J et al. Effect of chronic viral hepatitis on graft survival in Saudi renal transplant patients. *Nephron Clin Pract* 102: c72-80; 2006
82. Morales JM, Campistol JM, Domínguez-Gil B, Andrés A, Esforzado N, Oppenheimer F, Castellano G, Fuertes A, Bruguera M, Praga M. Long-term experience with kidney transplantation from hepatitis C-positive donors into hepatitis C-positive recipients. *Am J Transplant.* 2010 Nov;10(11):2453-62.
83. Torres J, Aguado JM, San Juan R, Andrés A, Sierra P, López-Medrano F, Morales JM. Hepatitis C virus, an important risk factor for tuberculosis in immunocompromised: experience with kidney transplantation. *Transpl Int.* 2008 Sep;21(9):873-8.
84. Burra P, Buda A, Livi U, Rigotti P, Zanusi G, Calabrese F, Caforio A, Menin C, Canova D, Farinati F, Luciana Aversa SM. Occurrence of post-transplant lymphoproliferative disorders among over thousand adult

- recipients: any role for hepatitis C infection? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;18(10):1065-70.
85. Caillard S, Lelong C, Pessione F, Moulin B; French PTLN Working Group. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2735-42.
86. Caillard S, Agodoa LY, Bohen EM, Abbott KC. Myeloma, Hodgkin disease, and lymphoid leukemia after renal transplantation: characteristics, risk factors and prognosis. *Transplantation*. 2006 Mar 27;81(6):888-95.
87. Forman JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M, Lin J. Hepatitis C, acute humoral rejection, and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec;15(12):3249-55.
88. Morales JM, Campistol JM, Andrés A, Rodicio JL. Glomerular diseases in patients with hepatitis C virus infection after renal transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997 Nov;6(6):511-5.
89. Cruzado JM, Carrera M, Torras J, Grinyó JM. Hepatitis C virus infection and de novo glomerular lesions in renal allografts. *Am J Transplant*. 2001 Jul;1(2):171-8.
90. Cruzado JM, Gil-Vernet S, Ercilla G, Seron D, Carrera M, Bas J, Torras J, Alsina J, Grinyó JM. Hepatitis C virus-associated membranoproliferative glomerulonephritis in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Nov;7(11):2469-75.
91. Morales JM, Pascual-Capdevila J, Campistol JM, Fernandez-Zatarain G, Muñoz MA, Andres A, Praga M, Martinez MA, Usera G, Fuertes A, Oppenheimer F, Artal P, Darnell A, Rodicio JL. Membranous glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection in renal transplant patients. *Transplantation*. 1997 Jun 15;63(11):1634-9.
92. Fabrizi F, Messa P, Martin P. Novel evidence on hepatitis C virus-associated glomerular disease. *Kidney Int*. 2014 Sep;86(3):466-9.
93. Baid-Agrawal S, Pascual M, Moradpour D, Somasundaram R, Muche M. Hepatitis C virus infection and kidney transplantation in 2014: what's new? *Am J Transplant*. 2014 Oct;14(10):2206-20.

94. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Messa P. Meta-analysis of observational studies: hepatitis C and survival after renal transplant. *J Viral Hepat.* 2014 May;21(5):314-24.
95. Fabrizi F, Lunghi G, Dixit V, Martin P. Meta-analysis: anti-viral therapy of hepatitis C virus-related liver disease in renal transplant patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Nov 15;24(10):1413-22.
96. Rostami Z, Nourbala MH, Alavian SM, Bieraghdar F, Jahani Y, Einollahi B. The impact of Hepatitis C virus infection on kidney transplantation outcomes: A systematic review of 18 observational studies: The impact of HCV on renal transplantation. *Hepat Mon.* 2011 Apr;11(4):247-54.
97. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Dulai G. Hepatitis C virus antibody status and survival after renal transplantation: meta-analysis of observational studies. *Am J Transplant.* 2005 Jun;5(6):1452-61.
98. Scott DR, Wong JK, Spicer TS, Dent H, Mensah FK, McDonald S, Levy MT. Adverse impact of hepatitis C virus infection on renal replacement therapy and renal transplant patients in Australia and New Zealand. *Transplantation.* 2010 Dec 15;90(11):1165-71.
99. Rao KV, Ma J. Chronic viral hepatitis enhances the risk of infection but not acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1996 Dec 27;62(12):1765-9.
100. Morales JM, Fabrizi F. Hepatitis C and its impact on renal transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2015 Mar;11(3):172-82.
101. Esforzado N, Morales JM, Campistol JM. [Glomerulonephritis associated with chronic hepatitis C virus infection]. *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Jun-Jul;23(6):300-6.
102. Bruchfeld A, Wilczek H, Elinder CG. Hepatitis C infection, time in renal-replacement therapy, and outcome after kidney transplantation. *Transplantation.* 2004 Sep 15;78(5):745-50.
103. Knoll GA, Tankersley MR, Lee JY, Julian BA, Curtis JJ. The impact of renal transplantation on survival in hepatitis C-positive end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis.* 1997 Apr;29(4):608-14.
104. Gentil MA, Rocha JL, Rodríguez-Algarra G, Pereira P, López R, Bernal G, Muñoz J, Naranjo M, Mateos J. Impaired kidney transplant

- survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Oct;14(10):2455-60.
105. Roth D, Bloom R. Selection and management of hepatitis C virus-infected patients for the kidney transplant waiting list. *Contrib Nephrol*. 2012;176:66-76. doi: 10.1159/000333774. Epub 2012 Jan 30.
  106. Gloor JM, Cosio FG, Rea DJ, Wadei HM, Winters JL, Moore SB, DeGoey SR, Lager DJ, Grande JP, Stegall MD. Histologic findings one year after positive crossmatch or ABO blood group incompatible living donor kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Aug;6(8):1841-7.
  107. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolckoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AA, Schneeberger EE, Colvin RB. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Mar;12(3):574-82.
  108. Hanf W, Bonder CS, Coates PT. Transplant glomerulopathy: the interaction of HLA antibodies and endothelium. *J Immunol Res*. 2014;2014
  109. Messina M, Ariaudo C, Praticò Barbato L, Beltramo S, Mazzucco G, Amoroso A, Ranghino A, Cantaluppi V, Fop F, Segoloni GP, Biancone L. Relationship among C1q-fixing de novo donor specific antibodies, C4d deposition and renal outcome in transplant glomerulopathy. *Transpl Immunol*. 2015 Sep;33(1):7-12.
  110. Torres IB, Salcedo M, Moreso F, Sellarés J, Castellá E, Azancot MA, Perelló M, Cantarell C, Serón D. Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection. *Clin Transplant*. 2014 Oct;28(10):1148-54.
  111. Corell A, Morales JM, Mandroño A, Muñoz MA, Andrés A, Fuertes A, Arnaiz-Villena A. Immunosuppression induced by hepatitis C virus infection reduces acute renal-transplant rejection. *Lancet*. 1995 Dec 2;346(8988):1497-8.
  112. Matas AJ, Leduc R, Rush D, Cecka JM, Connett J, Fieberg A, Halloran P, Hunsicker L, Cosio F, Grande J, Mannon R, Gourishankar S,



- Gaston R, Kasiske B. Histopathologic clusters differentiate subgroups within the nonspecific diagnoses of CAN or CR: preliminary data from the DeKAF study. *Am J Transplant*. 2010 Feb;10(2):315-23.
113. Morales JM, Bloom R, Roth D. Kidney transplantation in the patient with hepatitis C virus infection. In: Ronco C, ed, *Contributions to Nephrology*. Vol 176: Hepatitis C in renal disease, hemodialysis and transplantation. Switzerland, 2012:77-86
  114. Feucht HE, Mihatsch MJ. Diagnostic value of C4d in renal biopsies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 Nov;14(6):592-8.
  115. Marcén R, Morales JM, Fernández-Rodríguez A, Capdevila L, Pallardó L, Plaza JJ, Cubero JJ, Puig JM, Sanchez-Fructuoso A, Arias M, Alperovich G, Serón D. Long-term graft function changes in kidney transplant recipients. *NDT Plus*. 2010 Jun;3(Suppl\_2):2-8.
  116. Bentall A, Cornell LD, Gloor JM, Park WD, Gandhi MJ, Winters JL, Chedid MF, Dean PG, Stegall MD. Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant*. 2013 Jan;13(1):76-85
  117. Hanf W, Bonder CS, Coates PT. Transplant glomerulopathy: the interaction of HLA antibodies and endothelium. *J Immunol Res*. 2014;2014:1-11.
  118. Morales JM, Domingo MJ, Fuertes A. Hepatitis C virus in renal transplant patients. *Am J Kidney Dis*. 1995 Oct;26(4):693.
  119. Ivanyi B. Transplant capillaropathy and transplant glomerulopathy: ultrastructural markers of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Apr;18(4):655-60.
  120. López Jiménez V, Fuentes L, Jiménez T, León M, Garcia I, Sola E, Cabello M, Gutierrez C, Burgos D, Ruiz P, Hernandez D. Transplant glomerulopathy: clinical course and factors relating to graft survival. *Transplant Proc*. 2012 Nov;44(9):2599-600.
  121. Maluf DG, Fisher RA, King AL, Gibney EM, Mas VR, Cotterell AH, Shiffman ML, Sterling RK, Behnke M, Posner MP. Hepatitis C virus infection and kidney transplantation: predictors of patient and graft survival. *Transplantation*. 2007 Apr 15;83(7):853-7.

122. Morales JM, Bloom R, Roth D. Kidney transplantation in the patient with hepatitis C virus infection. *Contrib Nephrol.* 2012;176:77-86.
123. Fabrizi F, Aghemo A, Messa P. Hepatitis C treatment in patients with kidney disease. *Kidney Int.* 2013 Nov;84(5):874-9.
124. Fabrizi F. Hepatitis C virus infection and dialysis: 2012 update. *ISRN Nephrol.* 2012 Dec 17;2013:159760.
125. Campistol JM, Esforzado N, Morales JM. Hepatitis C virus-positive patients on the waiting list for transplantation. *Semin Nephrol.* 2002 Jul;22(4):361-4.
126. Muñoz De Bustillo E, Ibarrola C, Colina F, Castellano G, Fuertes A, Andrés A, Aguado JM, Rodicio JL, Morales JM. Fibrosing cholestatic hepatitis in hepatitis C virus-infected renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Jun;9(6):1109-13.
127. Ozkok A, Yildiz A. Hepatitis C virus associated glomerulopathies. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 28;20(24):7544-54.
128. Remport A, Ivanyi B, Mathe Z, Tinckam K, Mucsi I, Molnar MZ. Better understanding of transplant glomerulopathy secondary to chronic antibody-mediated rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Dec 3.
129. Fotheringham J, Angel CA, McKane W. Transplant glomerulopathy: morphology, associations and mechanism. *Nephron Clin Pract.* 2009;113(1):1-7
130. Degos F. Natural history of hepatitis C virus infection. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11 Suppl 4:16-8.
131. Del Bello D, Ross MJ, Huprikar SS. Hepatitis C virus infection and kidney transplantation: newer options and a brighter future ahead? *Kidney Int.* 2015 Aug;88(2):223-5.
132. Domínguez-Gil B, Morales JM. Transplantation in the patient with hepatitis C. *Transpl Int.* 2009 Dec;22(12):1117-31.
133. Gordon CE, Balk EM, Becker BN, Crooks PA, Jaber BL, Johnson CA, Michael MA, Pereira BJ, Uhlig K, Levin A. KDOQI US commentary on the KDIGO clinical practice guideline for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2008 Nov;52(5):811-25.

134. Haas M. The significance of C4d staining with minimal histologic abnormalities. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Feb;15(1):21-7.
135. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickeleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M; Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014 Feb;14(2):272-83.